

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業：臨床試験推進研究

造血幹細胞移植を受けたライソゾーム病患者に対する 酵素補充療法の適応と 投与方法の確立に関する臨床研究計画の作成

平成19年度 総括・分担研究報告書

平成20（2008）年 3月

主任研究者 奥山 虎之

目 次

I. 総括研究報告

造血幹細胞移植を受けたライソゾーム病患者に対する酵素補充療法の適応と
投与方法の確立に関する臨床研究計画の作成

奥山 虎之 ----- 1

II. 分担研究報告

1. ムコ多糖症Ⅱ型における造血幹細胞移植の後方視的研究

加藤 俊一 ----- 5

2. ムコ多糖症の治療効果の評価プロトコールの作成

田中 あけみ ----- 9

3. 造血幹細胞移植を受けたライソゾーム病患者に対する酵素補充療法の適応と
投与方法の確立に関する臨床研究計画の作成

奥山 虎之 ----- 13

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 15

總 括 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
総括研究報告書

造血幹細胞移植を受けたライソゾーム病患者に対する酵素補充療法の適応と
投与方法の確立に関する臨床研究計画の作成

主任研究者 奥山虎之 国立成育医療センター臨床検査部長

研究要旨

ライソゾーム病の代表的な疾患であるムコ多糖症Ⅱ型（ハンター症候群）の酵素補充療法製剤が、昨年10月に承認され、わが国でも使用が開始された。既存の治療法である造血幹細胞移植療法の後方視的な検討と日本人を対象とした酵素製剤の試験的投与の結果をもとに、骨髄移植と酵素補充療法の使い分けや併用の可能性を検討した。

分担研究者

田中あけみ（大阪市立大学・大学院医学研究科・発達小児医学・准教授）

加藤俊一（東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・教授）

承を、イデュロサルファーゼの投与試験は、各医療施設での倫理委員会の承諾の下で行った。

C. 研究結果

（1）1985～2005年の期間にわが国において実施されたムコ多糖症Ⅱ型における造血幹細胞移植症例は44例の男児で、初回移植時の年齢は0～11歳であった。初回移植時のドナーは19例が血縁者（同胞17例、母親2例）、25例で非血縁者であり、35例でHLAが一致していた。移植細胞源は39例で骨髄、5例で臍帯血であった。34例（77.3%）では初回移植でドナー由来の生着が得られ、8例（18.2%）では拒絶された。生着に対して有利に有意の相関を示していた因子としては、移植細胞源としての骨髄（臍帯血に対して）、同胞ドナー、HLA適合ドナーなどであった。6例で再移植、1例では再々移植が行われ、最終的には39例（88.6%）が生存中で、5例（11.4%）が死亡していた。

（2）日本人軽症ハンター症候群患者10名に対して、未承認薬であるイデュロサルファーゼの投与試験を行った。肝臓サイズの正常化と尿中のグリコサミノグリカンの

A. 研究目的

ムコ多糖症Ⅱ型酵素製剤イデュロサルファーゼが昨年10月に承認された。本研究では、酵素補充療法の全国的な普及に先駆けて、既存治療のひとつである造血幹細胞移植の再評価を行うとともに、造血幹細胞移植との比較検討と併用療法の可能性について検討する。

B. 研究方法

（1）日本造血細胞移植学会と日本小児血液学会が共同で行っている造血幹細胞移植全国集計データを基にして、わが国において1985年～2005年に造血幹細胞移植が施行されたムコ多糖症Ⅱ型の患者44例について、患者背景、移植方法、移植結果などについて検討した。

（2）イデュロサルファーゼは、わが国での臨床試験を実施せずに海外治験データに基づく迅速審査で承認された。治験未実施のデメリットを克服するために、イデュロサルファーゼの投与試験を、多施設共同で行った。

（倫理面への配慮）

造血幹細胞移植症例の調査研究については、小児血液学会倫理委員会での審議・了

著明な低下を全例で認めた。また、いずれの症例でも、投与を断念するような重篤な副作用は認めず、日本人症例に対しても安全に投与できる薬剤であることが確認された。

D. 考察

ムコ多糖症 I I 型に対して、わが国では例外的に造血幹細胞移植が行われている。今回確認できた 44 例中 34 例 (77.3%) で生着を認めた。しかし、移植関連死亡も 5 例 (11.4%) あり、リスクがかならずしも低いことも明らかとなった。一方、酵素補充療法は、海外での治験結果と同様に日本でも投与後早期に臨床症状の改善を認め、しかも重篤な有害事象の発生も軽度であり、安全性の高い治療法であることが示された。しかし、酵素補充療法には、週 1 回という頻回の通院が必要であること、継続的な治療となるため、高額医療となることなど問題もある。両治療法のリスクとベネフィットを考えた場合、診断確定直後は、まず酵素補充療法を開始し全身状態を改善するとともに、永続的治療効果が望める造血幹細胞移植も考慮するというのが望ましい方法と考えられる。

E. 結論

ハンター症候群の治療法として、造血幹細胞移植と酵素補充療法の適切な組み合わせが必要である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

ムコ多糖症 I I 型における造血幹細胞移植では、移植に関連した死亡が約 10% である。酵素製剤イデュロサルファーゼでは、重篤

な副作用は少ない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 田中あけみ：ムコ多糖症治療法の進歩。日本小児科学会雑誌 111 (10) :1255-62 (2007)

2) 加藤俊一. 副腎白質ジストロフィーにおける造血幹細胞移植. BRAIN and NERVE, 59:339-346, 2007.

3) Ishiguro H, Yasuda Y, Tomita Y, Shinagawa T, Shimizu T, Morimoto T, Hattori K, Matsumoto M, Inoue H, Yabe H, Yabe M, Shinohara O, Kato S. Gonadal shielding to irradiation is effective in protecting testicular growth and function in long-term survivors of bone marrow transplantation during childhood or adolescence. Bone Marrow Transplant 39:483-90, 2007.

2. 学会発表

1) 田中あけみ、澤田智、鈴木康之、奥山虎之、山野恒一。ムコ多糖症 II 型と III 型における知能障害の発生機序と造血幹細胞移植の知能障害への高価に関する研究。第 49 回日本先天代謝異常学会：(山形) 平成 19 年 11 月

2) 鈴木康之、折居建治、奥山虎之、田中藤樹、田中あけみ、井田博之、衛藤義勝、折居忠夫。ムコ多糖症 I 型・II 型の全国疫学調査。第 49 回日本先天代謝異常学会：(山形) 平成 19 年 11 月

3) 鈴木康之、奥山虎之、田中あけみ、井田博之、衛藤義勝、折居忠夫。ムコ多糖症 II 型の酵素補充療法：日本人 14 例の解析。

第 49 回日本先天代謝異常学会：(山形)
平成 19 年 11 月

4) 澤田智、田中あけみ、麻生和良、他。ム
コ多糖症の酵素補充療法：I 型 5 例、II
型 4 例の使用経験。第 111 回日本小児科
学会：(東京) 平成 20 年 4 月

5) Kato S, Yabe H, Takakura H, et al. H
SCT for inborn errors in metabolism: A
national survey in Japan. International
Symposium of Lysosomal Storage Diseases.
November 30, 2007, Tokyo.

6) Takakura H, Shimizu T, Kato S, et al.
Hematopoietic Stem Cell Transplantation
for inborn errors in metabolism: A
national survey in Japan. ASBMT,
February 14, 2008, San Diego.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特許取得なし。
実用新案登録なし。

分 担 研 究 報 告

ムコ多糖症Ⅱ型における造血幹細胞移植の後方視的研究

分担研究者 加藤俊一（東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・教授）
研究協力者 矢部普正（東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・講師）
研究協力者 清水崇史（東海大学医学部専門診療学系小児科学・講師）
研究協力者 高倉広充（東海大学医学部専門診療学系小児科学・助教）

研究要旨

わが国において1985年～2005年に造血幹細胞移植が施行されたムコ多糖症Ⅱ型の患者44例について、その臨床的特徴、移植方法、移植結果、治療効果を検討した。

初回移植時の年齢は0～11歳で、ドナーは19例が血縁者（同胞17例、母親2例）、25例で非血縁者であり、35例でHLAが一致していた。移植細胞源は39例で骨髄、5例で臍帯血であった。移植前処置は18例で放射線照射を含むレジメンが、29例でブスルファン＋エンドキサンを主体としたレジメンが用いられていた。

34例（77.3%）では初回移植でドナー由来の生着が得られ、8例（18.2%）では拒絶され、2例では生着の有無が不明であった。6例で再移植、1例では再々移植が行われ、最終的には39例（88.6%）が生存中で、5例（11.4%）が死亡していた。

ドナー細胞の生着が得られた上での生存（無イベント生存）に有意に有利に相関していた因子としては移植細胞源としての骨髄、同胞ドナー、HLA適合、非照射前処置（ブスルファン主体の前処置）などであったが、多変量解析では移植細胞源が骨髄であるか臍帯血であるかのみが有意な因子となっていた。

以上より、現時点ではHLA適合の同胞または非血縁者からの骨髄移植が最も安定した成績が期待されるという結論が得られた。

A. 研究目的

本邦で実施されたムコ多糖症Ⅱ型における造血幹細胞移植の成績を後方視的に解析し、標準的治療法を開発することにある。本年度はこれまでわが国において実施されたムコ多糖症Ⅱ型に対する造血幹細胞移植について詳細な解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

今年度の分担研究では、日本造血細胞移植学会と日本小児血液学会が共同で行ってい

る造血幹細胞移植全国集計データを基にして、わが国において1985年～2005年に造血幹細胞移植が施行されたムコ多糖症Ⅱ型の患者44例について、患者背景、移植方法、移植結果などについて検討した。

なお、データの利用にあたっては日本小児血液学会造血幹細胞移植委員会ならびに造血幹細胞移植全国収集データ管理委員会の承認をえて、匿名化されたデータのみを解析した。

C. 研究結果

1) 移植概況

1985～2005年の期間にわが国において実施されたムコ多糖症Ⅱ型における造血幹細胞移植症例は44例で、再移植が6回、3回目の移植が1回行われていた。

2) 症例概要

対象となった症例はすべて男児で、初回移植時の年齢は0～11歳であった。

3) ドナーおよび移植細胞源

初回移植時のドナーは19例が血縁者（同胞17例、母親2例）、25例で非血縁者であり、35例でHLAが一致していた。移植細胞源は39例で骨髄、5例で臍帯血であった。

4) 移植前処置

移植前処置は18例で放射線照射を含むレジメンが、29例でブスルファン+エンドキサンを主体としたレジメンが用いられていた。

5) 生着

34例（77.3%）では初回移植でドナー由来の生着が得られ、8例（18.2%）では拒絶され、2例では生着の有無が不明であった。生着に対して有利に有意の相関を示していた因子としては、移植細胞源としての骨髄（臍帯血に対して）、同胞ドナー、HLA適合ドナーなどであった。

5) 生存率

6例で再移植、1例では再々移植が行われ、最終的には39例（88.6%）が生存中で、5例（11.4%）が死亡していた。

初回移植の粗生存率（OS）と無イベント生存率（EFS、ドナー細胞の永続的な生着が得られた生存率）に有意に有利に相関して

いた因子としては移植細胞源としての骨髄、同胞ドナー、HLA適合、非照射前処置（ブスルファン主体の前処置）などであったが、多変量解析では移植細胞源が骨髄であるか臍帯血であるかのみが有意な因子となっていた。

D. 考察と結論

ムコ多糖症の病型は人種によって異なっており、白人集団ではⅠ型のHurler病の頻度が高いのに対して日本などのアジア人ではⅡ型のHunter病の頻度が高い。そのため、ムコ多糖症に対する移植全体に占めるⅡ型の割合が61%と半数以上となっている。

欧米ではムコ多糖症Ⅱ型に対する造血幹細胞移植の適応について否定的な意見が多く、海外での移植例数は極めて少ないのが現状である。

今回の調査により、わが国におけるムコ多糖症Ⅱ型に対する造血幹細胞移植の実施状況が詳細に把握された。移植の成否を左右する因子として、ドナーとのHLA適合度、移植細胞源などが重要であることが明らかにされた。

今後、造血幹細胞移植の効果について詳細な検討を進め、酵素補充療法との比較を行っていく必要がある。

E. 健康危険情報

該当なし。

F. 研究発表

1) 学会発表

1) Kato S, Yabe H, Takakura H, et al. H SCT for inborn errors in metabolism; A national survey in Japan. International Symposium of Lysosomal Storage Diseases. November 30, 2007, Tokyo.

2) Takakura H, Shimizu T, Kato S, et al. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for inborn errors in metabolism; A national survey in Japan. ASBMT, February 14, 2008, San Diego.

2) 論文

1) 加藤俊一. 副腎白質ジストロフィーにおける造血幹細胞移植. BRAIN and NERVE、59 :339-346, 2007.

2) Ishiguro H, Yasuda Y, Tomita Y, Shinagawa T, Shimizu T, Morimoto T, Hattori K, Matsumoto M, Inoue H, Yabe H, Yabe M, Shinohara O, Kato S. Gonadal shielding to irradiation is effective in protecting testicular growth and function in long-term survivors of bone marrow transplantation during childhood or adolescence. Bone Marrow Transplant 39:483-90, 2007.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得 なし

実用新案登録 なし

その他 なし

造血幹細胞移植を受けたライソゾーム病患者に対する酵素補充療法の適応と投与方法の確立に関する臨床研究計画の作成

分担研究者：田中あけみ（大阪市立大学・大学院医学研究科・発達小児医学・准教授）

研究要旨

2007 年 10 月にムコ多糖症 II 型の酵素治療薬が承認され、全国的に酵素補充療法が行われるようになった。すでに造血幹細胞移植を受けた II 型患者の中にも、酵素補充療法を受けている症例が全国で数名ある。当科で造血幹細胞移植後の経過観察を続けている症例 6 例（軽症型 2 例、重症型 4 例）の効果を検討したところ、皮膚所見は全症例でほぼ正常、肩関節可動域でも日常生活にはほぼ差支えが無かった。さらに、全症例で肝臓の腫大はほぼ正常にまで改善し、心機能においても生活に支障がないレベルが保たれていた。骨の変形による運動機能の障害や知能障害以外については、効果が十分に発揮されていると思われる。したがって、造血幹細胞移植を行った症例にさらに酵素補充療法を加えることにより、残る障害がより改善されるとは考えにくいと結論した。

研究協力者：澤田智（大学院生）

A. 研究目的

2007 年 10 月にムコ多糖症 II 型の酵素治療薬が承認され、全国的に保険診療がなされるようになった。すでに造血幹細胞移植を受けた II 型患者の中にも、酵素補充療法を受けている症例が現在数名ある。当科において造血幹細胞移植後に経過観察を行っている症例について、その効果を検討することにより、さらに酵素補充療法を加えることが更なる効果を期待できるかを考察する。

B. 研究方法および対象

造血幹細胞移植を施行したムコ多糖症 II 型軽症型 2 例、重症型 4 例の患者について

臨床経過を観察した。造血幹細胞移植は、軽症型では 6～9 歳、重症型では 2～6 歳で行っている。移植後の経過年数は、0.5 年～19 年である。さらに、酵素補充療法単独の 4 症例（全て軽症型）の治療経過と効果を比較した。

C. 研究結果

造血幹細胞移植症例の効果を表 1 に、酵素補充療法の症例の効果を表 2 に示した。

D. 結論と考察

造血幹細胞移植により、皮膚所見は全症例でほぼ正常、肩関節可動域でも日常生活にはほぼ差支えが無かった。さらに、全症例で肝臓の腫大はほぼ正常にまで改善し、心機能においても生活に支障がないレベル

が保たれていた。症例1において、やや効果が乏しいのは、ドナーがヘテロ保因者である理由からかもしれない。症例5は、移植後の経過時間が短いので、まだ十分な効果が現れていないことが推測された。

II型の自然歴において、重症型では10歳を過ぎるとけいれんが起る症例も多く、歩行障害や心肺機能の低下から車椅子の状態になる症例がほとんどであるのに対し、造血幹細胞移植を行った症例の全てにおいて、知的障害はあるものの運動機能に障害はなかった。軽症型においても、自然歴では20歳を過ぎると心肺機能が低下して歩行や労作に困難が生じてくるが、27歳の症例1では手足の動きが不自由であること以外、生活に支障はない。

これらの造血幹細胞移植を行った症例の効果を自然歴と比べてみると、骨の変形による運動機能の障害や知能障害以外については、効果が十分に発揮されていると思われる。さらに、酵素補充療法を行った症例の効果(表2)と比べてみても、造血幹細胞移植の効果は十分なものと考えられ、酵素補充療法が造血幹細胞移植に勝る効果を発揮できるとは言いがたい。したがって、造血幹細胞移植を行った症例にさらに酵素補充療法を加えることにより、残る障害がより改善されるとは考えにくいと結論する。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 田中あけみ：ムコ多糖症治療法の進歩。
日本小児科学会雑誌 111 (10) : 1255
-62 (2007)

2. 学会発表

- 1) 田中あけみ、澤田智、鈴木康之、奥山虎

之、山野恒一。ムコ多糖症II型とIII型における知能障害の発生機序と造血幹細胞移植の知能障害への高価に関する研究。第49回日本先天代謝異常学会：(山形)平成19年11月

- 2) 鈴木康之、折居建治、奥山虎之、田中藤樹、田中あけみ、井田博之、衛藤義勝、折居忠夫。ムコ多糖症I型・II型の全国疫学調査。第49回日本先天代謝異常学会：(山形)平成19年11月

- 3) 鈴木康之、奥山虎之、田中あけみ、井田博之、衛藤義勝、折居忠夫。ムコ多糖症II型の酵素補充療法：日本人14例の解析。第49回日本先天代謝異常学会：(山形)平成19年11月

- 4) 澤田智、田中あけみ、麻生和良、他。ムコ多糖症の酵素補充療法：I型5例、II型4例の使用経験。第111回日本小児科学会：(東京)平成20年4月

表 1、造血幹細胞移植

症例	年齢	移植時年齢	移植後 経年	ドナー	肩関節 可動域*	皮膚	肝腫大	心機能		呼吸機能 (%FVC)	生活状況	脳萎縮
								NYHA	EF			
1 (軽)	27	9歳1ヶ月	19年	同胞へテロ	II	正常	+	I	82		就労	-
2 (軽)	16	6歳0ヶ月	10年	同胞正常	I	正常	-	I	77	62.4	普通学校	-
3 (重)	13	5歳5ヶ月	8年	臍帯血	I	正常	±	I	72	35.1	養護学級	-
4 (重)	11	2歳1ヶ月	9年	同胞正常	I	正常	-	I	82		養護学級	-
5 (重)	7	6歳6ヶ月	0.5年	同胞正常	0~I	正常	+	I	79		養護学級	+
6 (重)	7	3歳7ヶ月	4年	母	0~I	正常	-	I	-		養護学級	-

表 2、酵素補充療法

症例	年齢	開始時年齢	治療期 間	ドナー	肩関節 可動域*	皮膚	肝腫大	心機能		呼吸機能 (%FVC)	生活状況	脳萎縮
								NYHA	EF			
1 (軽)	9	5歳	4年	-	III	正常	+	I	74	77.7	普通学校	-
2 (軽)	28	27歳	1年	-	III	正常	+	III	15	40.0	自宅療養	-
3 (軽)	24	23歳	9ヶ月	-	III	正常	+	II	84	19.1	自宅療養	-
4 (軽)	54	53歳	6ヶ月	-	III	正常	+	III	60	56.0	自宅療養	-

(軽)：軽症型、(重)：重症型

*肩関節可動域： 0：180° ほぼ垂直挙上、I：150° 前後、II：120° 前後、III：90° 前後

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

造血幹細胞移植を受けたライソゾーム病患者に対する酵素補充療法の適応と投与方法の確立に関する臨床研究計画の作成

分担研究者 奥山虎之 国立成育医療センター臨床検査部長

研究要旨

ライソゾーム病の代表的な疾患であるムコ多糖症Ⅱ型（ハンター症候群）の酵素補充療法製剤が昨年10月に承認され、わが国でも使用が開始された。患者救済を目的に、わが国の臨床試験は行われず、海外治験データによる迅速審査で承認された。治験未実施のデメリットを克服するために、多施設共同研究として、日本人ハンター病患者10名に対して投与試験を行い、短期間の効果と安全性を検証した。

研究協力者

田中藤樹 国立成育医療センター遺伝診療科

において、同意説明文書にて本治療研究に関する説明を行い、同意を得た。

C. 研究結果

患者はいずれも男性で10症例、年齢は21～53歳、発症時年齢は0～16歳、病型はいずれも軽症型であった。明らかな改善を認めればは、努力肺活量、肝臓容積、尿中ウロン酸濃度の3項目であった。また、欧米の臨床試験での主要評価項目であった6分間歩行テストでは、投与前後での明らかな変化は認められなかった。また、投与を断念しなければならないような重篤な副作用は認めなかった。以下、努力肺活量、肝臓容積、尿中ウロン酸濃度の詳細を記述する。

A. 研究目的

ムコ多糖症Ⅱ型酵素製剤イデュロサルファーゼが、日本人患者を対象とした臨床試験を行わずに承認された。本研究では、治験未実施のデメリットを克服するために、日本人ムコ多糖症Ⅱ型患者を対象とした投与試験を実施した。短期間の治療効果とリスク評価を行った。

B. 研究方法

20歳以上でムコ多糖症ⅠⅠ型と診断された10名の患者を対象として、米国ジェンザイム社からIdursulfase倫理供給プログラムにより供給された酵素製剤を利用して、投与試験を行った。観察項目は、人口統計学的特性、病歴、Idursulfase投与時（Idursulfase投与状況、バイタルサイン及び酸素飽和度、有害事象、併用薬）、身体所見、脳MRI、脊柱MRI、視力検査、網膜検査、角膜検査、聴覚検査、心エコー、ECG、FVC、FEV₁、6MWT、Desaturation Index、肝臓サイズ、脾臓サイズ、関節可動域、X線による骨格検査、身長・体重、血圧、酵素活性値、尿中ウロン酸濃度、臨床検査、抗体検査、ADLとし、調査期間は1年間とした。

（倫理面への配慮）

未承認薬投与に関する施設内倫理委員会の承認を得た。また、全患者に

- (1) 努力肺活量 FVC (L) は、投与前後のデータのある4例中3例にFVC (L)の増加が認められ、1例はわずかな減少が認められた。初回評価から3ヵ月後までのデータのある5例全例でFVC (L)の増加が認

められた。

- (2) 肝臓容積は、投与前後のデータのある4例全例に初回評価時と比べて肝臓容積の明らかな減少が認められた。また、初回評価から投与3ヵ月後までのデータのある5例全例に肝臓容積の減少が認められた。
- (3) 尿中ウロン酸濃度の推移は、投与前後のデータのある4例全例が尿中ウロン酸濃度の明らかな減少が認められた。初回評価から投与3ヵ月後までのデータのある5例中4例においても著しい減少が認められた。

D. 考察

本研究により、短期間で肝臓サイズの正常化、尿中ウロン酸濃度の急激な低下、呼吸機能の改善が認められることが明らかとなった。これは、欧米で行われた臨床試験と矛盾しない結果であり、日本人ムコ多糖症II型患者に対しても、安全に投与できることが確認された。

E. 結論

本研究結果により、Idursulfaseの6ヵ月間の投与により欧米での臨床試験と同様に効果と安全性が日本人ムコ多糖症患者で燃えられることが明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

鈴木康之、奥山虎之 他。ムコ多糖II型の酵素補充療法：日本人14例の検討 第49回日本先天代謝異常学会 2007年11月15日 山形

H. 知的財産権の出願・登録状況なし

研究成果の刊行物・別刷り

ORIGINAL ARTICLE

Gonadal shielding to irradiation is effective in protecting testicular growth and function in long-term survivors of bone marrow transplantation during childhood or adolescence

H Ishiguro¹, Y Yasuda¹, Y Tomita¹, T Shinagawa¹, T Shimizu^{1,2}, T Morimoto¹, K Hattori¹, M Matsumoto¹, H Inoue¹, H Yabe¹, M Yabe¹, O Shinohara¹ and S Kato^{1,3}

¹Department of Pediatrics, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan; ²Department of Pediatrics, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan and ³Department of Cell Transplantation & Regenerative Medicine, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan

An increasing number of long-term surviving bone marrow transplantation (BMT) recipients have recovered from their primary disease but are at risk of developing failure of endocrine organs. We investigated 30 recipients who underwent allogeneic BMT during childhood or adolescence. Testicular growth and function were evaluated by serial measurement of testicular volume, basal luteinizing hormone (LH), basal follicle-stimulating hormone (FSH) and testosterone levels and by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) provocative test. Puberty started spontaneously in all patients. However, all except four patients had normal testosterone levels with elevated LH, indicating partial Leydig cell dysfunction. Standard deviation scores of testicular volume at last evaluation were statistically lower in those who had received irradiation without gonadal shield compared to those with (-2.04 ± 0.45 vs -0.30 ± 1.17 , respectively, $P < 0.005$), suggesting damage of testicular germinal epithelium owing to gonadal irradiation. Serial measurement of testicular volume showed a tendency of growth to stop at 10 ml in those without gonadal shield. Among the 30 patients, only one patient has fathered a child after reaching spontaneous puberty. These results suggest that gonadal shield is effective to protect testicular growth and function, although the attainment of fertility is difficult to achieve.

Bone Marrow Transplantation (2007) 39, 483–490.
doi:10.1038/si.bmt.1705612: published online 5 March 2007

Introduction

Large numbers of children with malignant and non-malignant disease have recovered from their primary disease after bone marrow transplant (BMT) and now are surviving long term. However, they are at risk of developing failure of several important organs as a result of toxic effects of the intensive treatment before, during and after BMT.^{1,2} Late effects and complications are heterogeneous, and although often not life threatening, they significantly impair the quality of life of survivors.³ Among the endocrine complications following BMT that have been described,⁴ testicular dysfunction frequently occurs in male long-term survivors.⁵

Testicular dysfunction occurs both in adolescence and in adult following BMT, mainly owing to chemotherapy⁶ and/or total body irradiation (TBI) in conditioning regimen,⁷ and it results in incomplete sexual development at puberty. Recipients transplanted during childhood usually experience spontaneous pubertal development and completion of puberty. However, they might not achieve a normal testicular volume as a result of damage to the testicular germinal epithelium.⁷ The intensive treatment before BMT may have a direct toxic effect on the Leydig cell, but there is also some evidence that the damage to the germinal epithelium and reduction in testicular volume may affect the Leydig cell function by causing structural changes within the testis.⁶

Table 1 Patient characteristics

Characteristics		Group A	Group B	Group C
		Irradiation (+) Gonadal shield (-)	Irradiation (+) Gonadal shield (+)	Irradiation (-)
No. of patient	30	16	9	5
Age at BMT (years)				
<9	14	7	5	2
>10	16	9	4	3
Primary disease				
Malignant disease	19	16	1	2
ALL	8			
AML	5			
CML	3			
NHL	3			
Nonmalignant disease	11	0	8	3
SAA	7			
Others	4			
HLA				
Match	25	15	5	5
Mismatch	5	1	4	0
Conditioning regimen				
TBI ± CY ± other drugs	17	16	1	0
TAI ± CY ± other drugs	8	0	8	0
CY ± Bu + other drugs	5	0	0	5

Abbreviations: ALL = Acute lymphocytic leukemia; AML = acute myelogenous leukemia; BMT = bone marrow transplantation; CML = chronic myelogenous leukemia; NHL = non-Hodgkin lymphoma; SAA = severe aplastic anemia; HLA = human leukocyte antigens; TBI = total body irradiation; TAI = thoraco-abdominal irradiation; CY = cyclophosphamide; Bu = Busulfan.

and survived at least 7 years after BMT. They were older than 15 years at the time of the last visit and had no history of testicular dysfunction before BMT. At the time of BMT, written informed consent was obtained from either recipients or their parents for the treatment procedure and follow-up. Patient characteristics are shown in Table 1. The median age at BMT was 10.5 years (range 0.9–15.8 years), and the median follow-up duration after BMT was 13.3 years (range 7.6–21.2 years).

Transplantation procedure

Transplant conditioning regimens are shown in Table 1. Conditioning regimens for 25 patients consisted of irradiation combined with/without cyclophosphamide and/or other drugs. Six-to-12 Gy of TBI was given in 3–6 fractions,

host disease (GVHD) prophylaxis comprised methotrexate and/or cyclosporine.

A 13-year-old boy (UPN 212) with chronic myelogenous leukemia (CML) in the first chronic phase received human leukocyte antigens (HLA)-matched BMT after TBI with chemotherapy-based conditioning regimen in 1996. His gonadal area was shielded from TBI, because we expected that the risk of leukemic relapse in the testes was very low in this case.

Evaluation of pubertal development

Pubertal development was carefully and serially observed and recorded. Onset of puberty was defined by a testicular volume ≥ 4 ml.¹¹ Testicular volume was determined using an orchidometer, as described by Prader.¹² Testicular measurement using orchidometer was performed by a

and serum testosterone levels. Normal basal serum LH and FSH values in our institute were <5 and <9 IU/l, respectively. In addition, all patients had gonadotropin releasing hormone (GnRH) stimulation test as part of endocrine evaluation after BMT. A dose of $100 \mu\text{g}/\text{m}^2$ body surface area of LH-RH (maximum $100 \mu\text{g}$) was given intravenously, and serum LH and serum FSH were measured before and at +30, +60, +90 and +120 min. Normal response to GnRH stimulation should not exceed 30 IU/l in peak serum LH and peak serum FSH according to the data in healthy children who were referred to our pediatric endocrinology clinics for endocrine examination because of too short stature. All measurements were performed in the central laboratory of our hospital. Endocrine tests were undertaken in the morning to avoid diurnal variation of hormones.

Definition of testicular dysfunction

Normal testicular function was defined by the occurrence of spontaneous pubertal development and normal gonadotropin levels. Partial Leydig cell dysfunction was defined by normal serum testosterone levels with increased basal serum LH levels (>15 IU/l) or with elevated peak LH (>40 IU/l) by provocative test; complete Leydig cell dysfunction was defined by low serum testosterone levels with increased serum LH levels or elevated peak LH. Testosterone/LH ratio was also used to assess Leydig cell function.¹⁴ Germinal epithelium damage was defined by a partial or complete absence of any increase in testicular volume at pubertal ages, and/or increased basal serum FSH levels (>20 IU/l) or elevated peak FSH level (>40 IU/l).

Testicular biopsy

Testicular biopsy was performed in six patients who received BMT between 1985 and 1990 for evaluation of histological testicular structure. It was performed by open biopsy under general anesthesia.

Statistical analysis

Because the data had a skewed distribution, median and range were used throughout the text, tables and figures. Only for analysis of testicular volumes at last evaluation, SDS of testicular volume was used. The Mann-Whitney test and the Kruskal-Wallis test were used to compare the differences between groups and among groups, respectively. The χ^2 test and Fisher's exact probability test were used to assess the association between groups. The results are presented in Box and Whisker plots in the Figure 4. These statistical analyses were carried out using the GraphPad PRISM statistical package. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Testicular volume

The median age of 30 patients at their last evaluation was 21.9 years (15.8–29.6 years). According to testicular volume, puberty started spontaneously in all patients irrespective of the presence or absence of irradiation in

the conditioning for BMT. Changes in testicular volume are shown in Figure 1a. In this study, we focused on testicular growth and function according to the presence of testicular irradiation. Relationship between testicular volume and patient characteristics (sex, age at BMT, disease, testicular irradiation, HLA and GVHD) was evaluated. There was the strongest relationship between testicular volume and testicular irradiation ($P < 0.0005$). Changes of testicular volume were sorted by type of irradiation (Figure 1b–d). Testicular volume at pubertal age (14 years old) is 16.4 ± 4.6 ml according to the reports on testicular growth of Japanese boys from birth to adolescence in cross-sectional series.¹³ Minimum of the normal range of testicular volume in adulthood is equal to testicular volume at pubertal age.¹⁵ Therefore, we used a fixed value after pubertal age (14 years old) for evaluation of testicular volume. Testicular volume of less than 10 ml or less at last evaluation was defined as testicular dysgenesis. The differences in the incidence of testicular dysgenesis among three types of conditioning were statistically significant (Table 2, $P < 0.05$ for group A vs group B and group C and $P < 0.005$ for group A vs group B + C, respectively). In fact, group A showed a significantly smaller size in testicular volume SDS at last evaluation compared to group B and group C ($P < 0.005$ for group A (-2.04 ± 0.45) vs group B (-0.30 ± 1.17); $P < 0.05$ for group A and group C (-0.96 ± 0.57) and $P < 0.0005$ for group A vs group B + C (-0.96 ± 1.01), respectively). It is interesting to note that serial measurement of testicular volume showed a tendency of growth to stop up to 10 ml in group A.

Leydig cell dysfunction

In all patients except three (UPN 1, 18 and 120 in group A), serum testosterone reached adult level at some time points after BMT (data not shown). There was no association between serum testosterone levels and patient characteristics (age at BMT, primary disease, conditioning regimen and type of irradiation). However, serial examination of gonadotropin levels revealed a tendency of basal and peak LH to rise to Leydig cell dysfunctional level around 20 years of age in group A (Figure 2a, d). All patients (16/16) in group A, 6/9 patients in group B and 4/5 patients in group C experienced raised peak LH levels with normal serum testosterone levels indicating the presence of partial Leydig cell dysfunction at some time during the follow-up period (Table 3). The difference between group A and group B was significant ($P < 0.05$), but the difference between group A and group C was not significant ($P = 0.24$). Leydig cell dysfunction was also assessed by the Testosterone/LH ratio (Figure 3). Reduced Leydig cell function was substantiated from diminished testosterone/LH ratio (median ratio 41.5 in group A, 87.6 in group B, 82.1 in group C and 86.9 in group B + C. $P < 0.005$ for group A vs group B, $P = 0.09$ for group A vs group C and $P < 0.005$ for group A vs group B + C, respectively).

Germinal epithelium damage

Serial examination of gonadotropin levels also revealed a remarkable tendency of basal FSH over rise to germinal epithelium damage level in group A but less in group B or

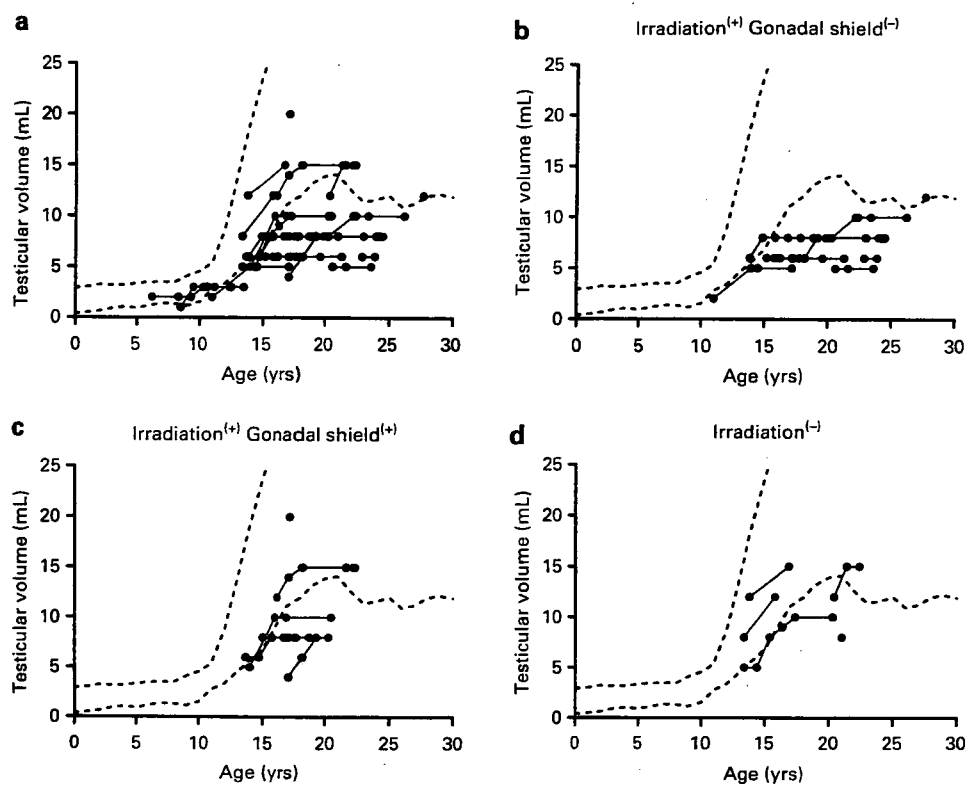


Figure 1 Changes in testicular volume after BMT. Connecting lines represent data from individuals. Dotted lines represent +2 s.d. (top) and -2 s.d. (bottom) of normal testicular volume in Japanese males, respectively.

Table 2 Testicular volume after BMT

Group	Type of irradiation	n	Testicular volume (median age, range)		Testicular volume s.d. score
			≤ 10 ml	≥ 12 ml	
A	Irradiation (+) gonadal shield (-)	16	15 (22.9, 15.0-28.3)	1 (27.7, 27.7)	-2.04 ± 0.45
B	Irradiation (+) gonadal shield (+)	9	4 (17.8, 16.8-20.3)	5 ^a (22.2, 17.3-23.0)	-0.30 ± 1.17 ^b
C	Irradiation (-)	5	2 (-, 20.3-21.0)	3 ^c (15.8, 13.8-22.4)	-0.96 ± 0.57 ^d
B + C	Irradiation (+) gonadal shield (+) + irradiation (-)	14	6 (19.5, 16.8-21.0)	8 ^e (21.9, 13.8-23.0)	-0.96 ± 1.01 ^f

Abbreviation: BMT = bone marrow transplantation.
Only statistically significant *P*-values are described in the table.
^a*P* < 0.05 for group A vs group B.
^b*P* < 0.005 for group A vs group B.
^c*P* < 0.05 for group A vs group C.
^d*P* < 0.05 for group A vs group C.
^e*P* < 0.005 for group A vs groups B + C.
^f*P* < 0.0005 for group A vs groups B + C.

group C around 20 years of age (Figure 4a-c, Table 3). Fifteen out of sixteen patients in group A showed markedly to moderately raised peak FSH levels, whereas 3/9 in group B and 1/5 in group C experienced mildly raised peak FSH levels after puberty, indicating complete damage of testicular germinal epithelium in group A and partial damage in groups B and C (Figure 4d-f, Table 3, *P* < 0.005 for group A vs group B and for group A vs group C and *P* < 0.0005 for group A vs group B + C, respectively).

Testicular biopsy was performed to clarify relationship between endocrinological change and pathological change in only six patients (five in group A and one in group B)

after 1 to 6 years post BMT, although number of biopsied recipients was limited. In group A, the testis showed atrophic seminiferous tubules and spermatogenesis was completely absent. No malignancy was noted. However, one group B patient showed well-developed seminiferous tubules with moderate number of spermatogonium.

Effect of testicular shielding from TBI

Although we experienced only one patient who is a 13-year-old boy (UPN 212) with CML in the first chronic phase received BMT after TBI with gonadal shielding, his