

that the multiple organ congestion observed in the Nkx2.5-CRT transgenic mice was caused by heart failure.

The Nkx2.5-CRT transgenic mice have abnormalities of the conduction system

ECGs were recorded on fully awake mice every week starting at 1-week of age. At 7-weeks, the Nkx2.5-CRT transgenic mice ECG demonstrated prolonged PR and QRS intervals compared with control mice (Fig. 3b). The heart rates in the Nkx2.5-CRT transgenic mice and control mice were similar within the first few weeks after birth, but the Nkx2.5-CRT transgenic mice showed a slowing of the heart rate at 5-weeks. Finally, the heart rate was 20.1% slower in the Nkx2.5-CRT transgenic mice ($n = 7$) than control mice ($n = 9$) at 7-weeks (Fig. 3c). The PR interval in the Nkx2.5-CRT transgenic mice was significantly prolonged in the 5-week-old mice and was 38% longer than the control mice at 7-weeks (transgenic mice; $n = 7$, control mice; $n = 10$) (Fig. 3d). The QRS interval from the Nkx2.5-CRT transgenic mice was significantly prolonged in the first week and 28.9% longer than the control mice in 7-week-old animals (transgenic mice; $n = 7$, control mice; $n = 10$) (Fig. 3e). Our findings

indicated that the Nkx2.5-CRT transgenic mice had abnormal conduction system through the AV node to His-Purkinje fiber.

Expression levels of Cx40, Cx43, MEF2C and HCN1 were decreased in the Nkx2.5-CRT transgenic mice

We investigated whether the Nkx2.5-CRT transgenic mice have altered expression of proteins related to heart arrhythmia or cardiomyopathy. Western blot analysis with anti-Cx43 antibodies and anti-Cx40 antibodies showed that the level of both the Cx43 and Cx40 protein was reduced and the lowering of the expression of Cx40 protein was remarkable (Fig. 4a). The expression of Cx40 was investigated by immunofluorescence staining on sections of control and the transgenic mice hearts. No signal was detected in the atria of transgenic mice treated with anti-Cx40 antibodies (Fig. 4b). The decreased expression levels of Cx43 and Cx40 protein were similar to prior report of transgenic mice overexpressing calreticulin in the heart driven by the cardiac α -MHC promoter (α -MHC-CRT transgenic mice) [7]. Next, RT-PCR analysis was performed on total RNA obtained from the hearts of the Nkx2.5-CRT transgenic mice and control mice every week until 3-weeks of age to

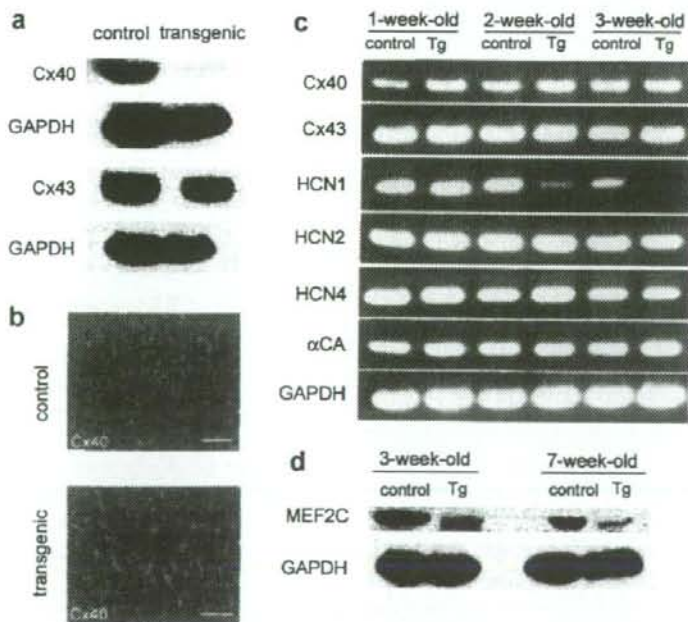


Fig. 4. Western blot and RT-PCR confirmation of altered protein and gene expression in the Nkx2.5-CRT transgenic mice. (a) Western blot analysis of Cx40, Cx43, and GAPDH in control and the transgenic mouse hearts at 7-weeks of age. (b) Expression pattern of Cx40 associated with cardiomyocytes in the atria of control and the transgenic mice by immunofluorescent staining. Sections were treated with rabbit anti-Cx40 antibodies. Nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole. (c) RT-PCR analysis performed on messenger RNA obtained from hearts of control and the transgenic mice at 1-, 2- and 3-weeks of age. Lane1 and lane2: 1-week-old heart from control (lane1) and transgenic mouse (lane2). Lane3 and lane4: 2-week-old heart from control (lane3) and transgenic mouse (lane4). Lane5 and lane6: 3-week-old heart from control (lane5) and transgenic mouse (lane6). Primers for Cx40, Cx43, HCN1, HCN2, HCN4, α CA and GAPDH were used. α CA: α -cardiac actin. (d) Western blot of MEF2C and GAPDH in the hearts of control and transgenic mice at 3- and 7-weeks of age.

observe gene expression over time (Fig. 4c). The expression of HCN1 was decreased 59.6% in the Nkx2.5-CRT transgenic mice compared with control mice at 2-weeks. The gene expression levels of both Cx40 and Cx43 unchanged between the Nkx2.5-CRT transgenic and control mice. There were no differences in the expression of other HCN subtype, i.e., HCN2 and HCN4, between the Nkx2.5-CRT transgenic mice and control mice. These findings suggest that heart specific overexpression of calreticulin lead to the decrease of HCN1 gene expression and to an arrhythmia characterized by bradycardia, and prolongation of the PR and QRS intervals.

We investigated MEF2C expression in the Nkx2.5-CRT transgenic mice hearts, since a previous study had indicated that expression of calreticulin is related to the transcriptional activity of MEF2C [6]. Western blotting analysis revealed that the protein level of MEF2C was reduced at 3-weeks and 7-weeks of age in the transgenic mice hearts compared with the control mice (Fig. 4d). It is considered that the decreased protein level of MEF2C in the transgenic mice hearts may affect chamber dilation.

In a previous study, it was shown the overexpression of calreticulin promotes differentiation-dependent apoptosis in H9c2 cells [15]. We examined the section of the hearts of 5- or 7-week-old Nkx2.5-CRT transgenic and control mice by TUNNEL staining. There were no significant differences in the number of TUNNEL positive cardiomyocyte between the Nkx2.5-CRT transgenic and control mice (data not shown).

Discussion

To study the role of calreticulin in the function of various mouse organs, we employed a cre-loxP mediated gene-switch approach. We have succeeded to generate transgenic mice with spatiotemporal overexpression of calreticulin using cre-loxP system. Transgenic mice with tissue specific overexpression of calreticulin can be obtained by intercrossing tissue specific-cre mice with loxP-CRT transgenic mice. As proof of the fact, the albumin-CRT transgenic mice expressed calreticulin specifically in the liver.

Especially in this study, to demonstrate the role of calreticulin in the heart development and its function, we have generated transgenic mice which overexpress calreticulin in the heart starting from an early stage of cardiogenesis using a cre-loxP system under control of the cardiac homeobox gene Nkx2.5 promoter. In recent studies, Nkx2.5-cre mice have been used for heart specific deletion and/or expression of various genes [16–18]. In an *in vivo* electrophysiological study, the QRS interval in the Nkx2.5-CRT transgenic mice was prolonged from 1-week of age. The PR interval was also prolonged from 5-weeks and bradycardia developed. Chamber dilation occurred and electron microscopy revealed the cardiomyocyte structures to be altered in these transgenic mice. The morphological changes of the cardiomyocytes seem to be a result of the dilated cardiomyopathy. A portion of the Nkx2.5-CRT transgenic mice showed

a severe cardiac edema around 7-weeks of age. Finally, they died suddenly in a period of 6- to 10-weeks of age. As shown in Western blot analysis, there is a difference in the expression level of calreticulin starting from the embryonic stage between the Nkx2.5-CRT transgenic and control mice. It is considered that the overexpression of calreticulin in the embryo may affect the phenotypic differences which were evident from the postnatal first week on electrocardiogram.

There are several experimental transgenic models of arrhythmia. The transgenic mice with a ventricular-restricted knockout of Nkx2.5 undergo progressive complete heart block [19]. However, these transgenic mice did not undergo sudden death, and are distinct from our Nkx2.5-CRT transgenic mice. Cx40 and Cx43, a family of proteins from which gap junctions are formed, are predominant in the conduction system. Cx40 null mice and mice with cardiac-specific loss of Cx43 have cardiac conduction abnormalities [20–22], but they have normal heart structure. By Western blot analysis, expression levels of Cx43 and Cx40 protein were decreased in the heart of the Nkx2.5-CRT transgenic mice. Arrhythmia observed in the Nkx2.5-CRT transgenic mice may involve impaired function of Cx43 and Cx40. On the other hand, it is reported that ventricular Cx43 expression is reduced in heart failure [23,24]. The decreased expression of Cx43 protein in the transgenic mice might be secondary phenomenon by heart failure. It is considered that the marked decrease in the level of Cx40 protein is characteristic for the transgenic mice.

The cardiac symptoms of Nkx2.5-CRT transgenic mice were similar to α -MHC-CRT transgenic mice, which exhibit sinus bradycardia, complete heart block and sudden death [7]. α -MHC-CRT transgenic mice dead suddenly around the postnatal age of 3 weeks and none survived beyond 5 weeks, but Nkx2.5-CRT transgenic mice underwent sudden death after 6-weeks of age. We hypothesized that there are two possible reasons why the onset of the disease is delayed in Nkx2.5-CRT transgenic mice compared with α -MHC-CRT transgenic mice. One reason may be the different degree of the myocyte abnormality. A more severe injury, such as intracellular vacuolization in myocytes, occurred in the α -MHC-CRT transgenic mice. The severely injured myocytes in α -MHC-CRT transgenic mice may accelerate the onset of the symptoms.

The second reason may be the difference of the expression patterns in the heart between Nkx2.5-cre recombinase and the α -MHC promoter. Lints et al. reported that Nkx2.5 expression is observed in the cardiac crescent at 7.5 days postcoitus and during differentiation and morphogenesis, and this expression is found across the whole myocardium of the heart. This pattern persists throughout embryonic and fetal development and transcripts can also be detected in the adult mouse heart [8]. On the other hand, Lyons et al. reported that between 7.5 and 8 days postcoitus, α -MHC gene starts to be expressed at high levels throughout the myocardium. After this increased expression, α -MHC mRNA levels decrease in ventricular muscle cells but con-

to be expressed at high levels in atrial muscle cells, then increase in ventricle before birth, and finally are expressed at a high level in ventricular muscle by 7 days after birth [25]. In α -MHC-CRT transgenic mice, the expression of calreticulin increased exclusively under the control of the α -MHC promoter in the ventricles before birth. This expression pattern may lead to uncompensated dysfunction to cause severe arrhythmia, subsequently sudden death in the early postnatal period. We think that Nkx2.5-CRT transgenic mice are a phenotypically-distinct model from α -MHC-CRT transgenic mice. These mice expressed calreticulin at a high level in the heart from an early stage of the embryo also maintain a high level of expression postnatally.

It is reported that low levels of cardiomyocyte apoptosis are sufficient to cause a lethal, dilated cardiomyopathy [26] and overexpression of calreticulin promotes differentiation-dependent apoptosis in H9c2 cells [15]. We investigated whether cardiomyocyte apoptosis occurred in the Nkx2.5-CRT transgenic mice. Surprisingly, TUNNEL staining revealed that the apoptotic cells did not increase in the Nkx2.5-CRT transgenic mice, compared with control mice. These results indicate that the Nkx2.5-CRT transgenic mice are a distinct model of arrhythmia compared to previous models.

To investigate whether the overexpression of calreticulin in the heart is directly related to the abnormal conduction system, we performed RT-PCR analysis of the heart. As a result, HCN1 expression was found to be reduced starting from the age of 2- to 3-weeks. The HCN family is an important ion channel family which regulates sinus node activity and resides specifically in the heart and brain. HCN family has been classified into the four isoforms HCN1, HCN2, HCN3 and HCN4 [27,28]. It has been reported that the loss of HCN 2 or HCN4 leads to an abnormality of the conduction system [29,30]. Previous research indicates that HCN1 is detected in the murine sinoatrial node [31]. HCN1 knockout mice exhibited profound motor learning and memory deficits in swimming and rotarod tasks, but they appeared with the expected Mendelian frequency and did not differ from their wild-type littermates in overall health and longevity [32]. In our RT-PCR analysis of the heart, HCN1 was expressed after birth and gradually decreased from 2-weeks of age. Although HCN1 null mice appeared healthy, the continuous decrease of HCN1 might not be compensated by other channels. The reduction of HCN1 may influence the observed arrhythmia in the Nkx2.5-CRT transgenic mice.

Previous reports suggested the expression of calreticulin is related for MEF2C [6] and MEF2C was shown to play a role in regulating cardiomyopathy, for example, transgenic mice that overexpress MEF2C specifically in the heart demonstrated a dosage-sensitive induction of dilated cardiomyopathy [33]. However, in other studies, it is revealed that mice expressing a dominant-negative mutant of MEF2C in the heart die during postnatal development, presumably due to a phenotype of ventricular dilation [34]. Thus, loss of

MEF2C function is relevant to chamber dilation. We investigated the protein level of MEF2C in the heart of our transgenic mice at 3- and 7-weeks of age. As a result of Western blot analysis, the Nkx2.5-CRT transgenic mice exhibit a low level of MEF2C in the heart. This result suggests that the decreased expression of MEF2C caused by overexpressing calreticulin in the heart may be associated with cardiomyopathy.

In summary, we have generated transgenic mice with spatiotemporal overexpression of calreticulin using a cre-loxP system. Specifically, overexpression of calreticulin from early cardiac development causes an abnormality of the conduction system and cardiac edema. As in the previous transgenic mice overexpressing calreticulin in the heart driven by the cardiac α -MHC promoter, decreased expressions of Cx43 and Cx40 protein were observed in the present transgenic mice. In terms of not observing such changes in the previous transgenic mice, the Nkx2.5-CRT transgenic mice exhibited marked cardiac edema and abnormalities of sarcomere structure in the heart. In addition, the expression of HCN1 was reduced in this study, which may induce arrhythmia, and a decreased level of MEF2C, which may be a contributory cause of the cardiomyopathy in this model. The disparity in phenotype may be due to the promoters causing overexpression of calreticulin in different periods of heart development. Our findings support calreticulin being critical for normal heart function and structure. Spatiotemporal overexpression of calreticulin in the transgenic mice is a useful model for the analysis of endoplasmic reticulum proteins, such as calreticulin, in various tissues, including cardiogenesis.

Acknowledgments

This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Research for the Future Program from the Japan Society for the Promotion of Science; a Grant-in-Aid for Scientific Research and a Grant-in-Aid for 21st Century COE Research (Cell Fate Regulation, Research and Education Unit) from the Ministry of Education, Science, Technology, Sports and Culture; a Grant-in-Aid for Pediatric Research from the Ministry of Health, Labor and Welfare; a Grant-in-Aid for the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology; National Agriculture and Bio-oriented Research Organization, Japan. We thank Tatsuko Kubo, Emi Harakawa, Kimiyo Okamoto for excellent technical assistance.

References

- [1] M. Michalak, E.F. Corbett, N. Mesaeli, K. Nakamura, M. Opas, Calreticulin: one protein, one gene, many functions, *Biochem. J.* 344 (1999) 281–292.
- [2] M. Michalak, J.M. Robert Parker, M. Opas, Ca^{2+} signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum, *Cell Calcium* 32 (2002) 269–278.
- [3] S.E. Webb, A.L. Miller, Calcium signalling during embryonic development, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (2003) 539–551.

- [4] N. Mesaali, K. Nakamura, E. Zvaritch, P. Dickie, E. Dziak, K.H. Krause, M. Opas, D.H. MacLennan, M. Michalak, Calreticulin is essential for cardiac development, *J. Cell Biol.* 144 (1999) 857–868.
- [5] J.D. Molkenin, J.R. Lu, C.L. Antos, B. Markham, J. Richardson, J. Robbins, S.R. Grant, E.N. Olson, A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy, *Cell* 93 (1998) 215–228.
- [6] J. Lynch, L. Guo, P. Gelebart, K. Chilibeck, J. Xu, J.D. Molkenin, L.B. Agellon, M. Michalak, Calreticulin signals upstream of calcineurin and MEF2C in a critical Ca^{2+} -dependent signaling cascade, *J. Cell Biol.* 170 (2005) 37–47.
- [7] K. Nakamura, M. Robertson, G. Liu, P. Dickie, K. Nakamura, J.Q. Guo, H.J. Duff, M. Opas, K. Kavanagh, M. Michalak, Complete heart block and sudden death in mice overexpressing calreticulin, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 1245–1253.
- [8] T.J. Lints, L.M. Parsons, L. Hartley, I. Lyons, R.P. Harvey, Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants, *Development* 119 (1993) 419–431.
- [9] K.A. Moses, F. DeMayo, R.M. Braun, J.L. Reedy, R.J. Schwartz, Embryonic expression of an Nkx2-5/Cre gene using ROSA26 reporter mice, *Genesis* 31 (2001) 176–180.
- [10] M. Michalak, K. Burns, C. Andrin, N. Mesaali, G.H. Jass, J.L. Busaan, M. Opas, Endoplasmic reticulum form of calreticulin modulates glucocorticoid-sensitive gene expression, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 29436–29445.
- [11] K. Okumura, K. Nakamura, Y. Hisatomi, K. Nagano, Y. Tanaka, K. Terada, T. Sugiyama, K. Umeyama, K. Matsumoto, T. Yamamoto, F. Endo, Salivary gland progenitor cells induced by duct ligation differentiate into hepatic and pancreatic lineages, *Hepatology* 38 (2003) 104–113.
- [12] Y. Hisatomi, K. Okumura, K. Nakamura, S. Matsumoto, A. Satoh, K. Nagano, T. Yamamoto, F. Endo, Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages, *Hepatology* 39 (2004) 667–675.
- [13] M.S. Sun, S. Hattori, S. Kubo, H. Awata, I. Matsuda, F. Endo, A mouse model of renal tubular injury of Tyrosinemia type 1: Development of de Toni Fanconi Syndrome and Apoptosis of Renal Tubular Cells in *Fah/Hpd* Double Mutant Mice, *J. Am. Soc. Nephrol.* 11 (2000) 291–300.
- [14] J.C. Perriard, A. Hirschy, E. Ehler, Dilated cardiomyopathy: a disease of the intercalated disc? *Trends Cardiovasc. Med.* 13 (2003) 30–38.
- [15] K. Kageyama, Y. Ihara, S. Goto, Y. Urata, G. Toda, K. Yano, T. Kondo, Overexpression of calreticulin modulates protein kinase B/Akt signaling to promote apoptosis during cardiac differentiation of cardiomyoblast H9c2 cells, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 19255–19264.
- [16] E.G. Stanley, C. Biben, A. Elefanty, L. Barnett, F. Koentgen, L. Robb, R.P. Harvey, Efficient Cre-mediated deletion in cardiac progenitor cells conferred by a 3'UTR-ires-Cre allele of the homeobox gene *Nkx2-5*, *Int. J. Dev. Biol.* 46 (2002) 431–439.
- [17] E.M. Zeisberg, Q. Ma, A.L. Juraszek, K. Moses, R.J. Schwartz, S. Izumo, W.T. Pu, Morphogenesis of the right ventricle requires myocardial expression of *Gata4*, *J. Clin. Invest.* 105 (2005) 1522–1531.
- [18] D.G. McFadden, A.C. Barbosa, J.A. Richardson, M.D. Schneider, D. Srivastava, E.N. Olson, The *Hand1* and *Hand2* transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner, *Development* 132 (2005) 189–201.
- [19] M. Pashmforoush, J.T. Lu, H. Chen, T.S. Amand, R. Kondo, S. Pradervand, S.M. Evans, B. Clark, J.R. Feramisco, W. Giles, S.Y. Ho, D.W. Benson, M. Silberbach, W. Shou, K.R. Chien, Nkx2-5 pathways and congenital heart disease; loss of ventricular myocyte lineage specification leads to progressive cardiomyopathy and complete heart block, *Cell* 117 (2004) 373–386.
- [20] A.M. Simon, D.A. Goodenough, D.L. Paul, Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block, *Curr. Biol.* 8 (1998) 295–298.
- [21] H.V. van Rijen, T.A. van Veen, M.J. van Kempen, F.J. Wilms-Schopman, M. Potse, O. Krueger, K. Willecke, T. Opthof, H.J. Jongasma, J.M. de Bakker, Impaired conduction in the bundle branches of mouse hearts lacking the gap junction protein connexin40, *Circulation* 103 (2001) 1591–1598.
- [22] D.E. Gutstein, G.E. Morley, H. Tamaddon, D. Vaidya, M.D. Schneider, J. Chen, K. Chien, H. Stuhlmann, G.I. Fishman, Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43, *Circ. Res.* 88 (2001) 333–339.
- [23] B.G. Petrich, X. Gong, D.L. Lerner, X. Wang, J.H. Brown, J.E. Saffitz, Y. Wang, c-jun N-terminal activation mediates downregulation of connexin43 in cardiomyocyte, *Circ. Res.* 91 (2002) 640–647.
- [24] J.E. Saffitz, A.G. Kleber, Effect of mechanical forces and mediators of hypertrophy on remodeling of gap junctions in the heart, *Circ. Res.* 94 (2004) 585–591.
- [25] G.E. Lyons, S. Schiaffino, D. Sassoon, P. Barton, M. Buckingham, Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle, *J. Cell Biol.* 111 (1990) 2427–2436.
- [26] D. Wencker, M. Chandra, K. Nguyen, W. Miao, S. Garantziotis, S.M. Factor, J. Shirani, R.C. Armstrong, R.N. Kitsis, A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure, *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 1497–1504.
- [27] M. Biel, A. Schneider, C. Wahl, Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation, *Trends Cardiovasc. Med.* 12 (2002) 206–212.
- [28] J. Stieber, F. Hofmann, A. Ludwig, Pacemaker channels and sinus node arrhythmia, *Trends Cardiovasc. Med.* 14 (2004) 23–28.
- [29] A. Ludwig, T. Budde, J. Stieber, S. Moosmang, C. Wahl, K. Holthoff, A. Langebartels, C. Wojtak, T. Munsch, X. Feil, R. Feil, M. Lancel, K.R. Chien, A. Konnerth, H.C. Pape, M. Biel, F. Hofmann, Absence of epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2, *EMBO J.* 22 (2003) 216–224.
- [30] J. Stieber, S. Herrmann, S. Feil, J. Loster, R. Feil, M. Biel, F. Hofmann, A. Ludwig, The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 15235–15240.
- [31] S. Moosmang, J. Stieber, X. Zong, M. Biel, F. Hofmann, A. Ludwig, Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 1646–1652.
- [32] M.F. Nolan, G. Malleret, K.H. Lee, E. Gibbs, J.T. Dudman, B. Santoro, D. Yin, R.F. Thompson, S.A. Siegelbaum, E.R. Kandel, A. Morozov, The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells, *Cell* 115 (2003) 551–564.
- [33] J. Xu, N.L. Gong, I. Bodi, B.J. Aronow, P.H. Backx, J.D. Molkenin, Myocyte enhancer factors 2A and 2C induce dilated cardiomyopathy in transgenic mice, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 9152–9162.
- [34] S.M. Kolodziejczyk, L. Wang, K. Balazsi, Y. DeRepentigny, R. Kothary, L.A. Megeny, MEF2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium, *Curr. Biol.* 9 (1999) 1203–1206.

ムコ多糖症のマス・スクリーニング

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

1. はじめに

ムコ多糖症は、先天性代謝異常症のなかのライソゾーム病（リソゾーム病）に分類される。すなわち、細胞内のライソゾームに存在する酵素が欠損している。ライソゾームは、生体での老廃物や不要なものを代謝分解する細胞内の場所で、ここには様々の加水分解酵素が存在する。このなかのムコ多糖を分解する酵素の活性が先天性に欠損すると、ムコ多糖症という疾患となる。ムコ多糖を分解する酵素はたくさんあり、10種類の酵素欠損症が知られており、臨床型としては大きく6つに分けられている（表1）。各病型の頻度は、欧米ではI型が最も多いのに対し、日本ではII型が最も多く6割を占める（日本ムコ多糖症親の会登録家族数より）。細胞のライソゾーム内に分解されないムコ多糖が経時的に蓄積していくことにより、種々の症状が現れ、進行し、死に至る。一般的な症状として、粗な顔貌、関節拘縮、骨変形、巨舌、肝脾腫、心障害、角膜混濁、聴力障害、知能障害などが知られているが、病型により出現が異なっている。また、重症型と呼ばれるものほど、より低年齢から症状が始まり、より急速に進行する。

最近、このムコ多糖症について新生児マス・スクリーニングを始めようという動きがある。

一部の病型のムコ多糖症に対して酵素補充療法という治療が保険診療により行われるようになったことが大きなきっかけである。しかし、ムコ多糖症のマス・スクリーニングは、20年以上まえからすでに議論されてきている。以下に、これまでの経緯とこれからの方向について、私見も含め述べることにする。

2. 背景

ムコ多糖症の治療法の始まりは、骨髄移植である。1981年、Hobbsら¹⁾により9歳のHurler病患者に行われたのが最初である。以来、今までに数多くのムコ多糖症患者に造血幹細胞移植（骨髄移植および臍帯血移植）が行われてきた。造血幹細胞移植は、病気のより早期に行うとより良い効果が得られるということが、当初より明らかであった。このことから、早期診断の必要性は言われていたものの、造血幹細胞移植には適切なドナーが必要であることから全ての患者に施せる治療法ではなく、さらに危険を伴う治療法であることから、マス・スクリーニングには至らなかった。また、表1に示したように、造血幹細胞移植の効果は病型によって大きく異なることも問題であった。すなわち、「確実な治療法がない」ということから、ムコ多糖症のマス・スクリーニングが大きく論ぜられることは今まで無かった。他方、ムコ多糖症患者の多くは症状が明らかになってから診断されるため、診断時年齢が4～5歳であり、すでに誕生した次子もまた患者であるという例も少なからずあった。そのため、「家族計画」という見地からマス・スクリーニングが言及されることもあったが、倫理的問題から取り上げられることは無かった。

<連絡先>

田中あけみ

〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-4-3
大阪市立大学大学院 医学研究科
発達小児医学

Tel: 06-6645-3816 Fax: 06-6636-8737

E-mail: akemi-chan@med.osaka-cu.ac.jp

表1. ムコ多糖症の病型と治療

病型 (別称)		欠損酵素		頻度% (日本人)	酵素治療薬 の状況	造血幹細胞 移植の効果	
I型	ムコ多糖症 I H型 (Hurler病)	α -L-Iduronidase	常染色体性 劣性遺伝	9.5	欧米で2003 年に承認、 日本で2006 年12月承認	○	
	ムコ多糖症 I H/S型 (Hurler/Scheie病)					○	
	ムコ多糖症 I S型 (Scheie病)					○	
II型	ムコ多糖症 II 型重症型 (Hunter病重症型)	Iduronate 2-sulfatase	X連鎖性 劣性遺伝	63.3	米国で2006 年7月承認、 日本で2007 年10月承認	△	
	ムコ多糖症 II 型中間型 (Hunter病中間型)					△	
	ムコ多糖症 II 型軽症型 (Hunter病軽症型)					○	
III型	ムコ多糖症 III A型 (Sanfilippo病A)	Heparan N-sulfatase	常染色体性 劣性遺伝	13.6	開発中	×	
	ムコ多糖症 III B型 (Sanfilippo病B)	α -N-Acetylglucosaminidase				開発中	×
	ムコ多糖症 III C型 (Sanfilippo病C)	Acetyl CoA: α -glucosamine acetyltransferase				予定なし	×
	ムコ多糖症 III D型 (Sanfilippo病D)	N-Acetylglucosamine 6-sulfatase				×	
IV型	ムコ多糖症 IV A型 (Morquio病A)	Galactose 6-sulfatase	常染色体性 劣性遺伝	9.5	世界治験 開始予定	×	
	ムコ多糖症 IV B型 (Morquio病B)	β -Galactosidase				予定なし	×
VI型	ムコ多糖症 VI 型 (Maroteaux-Lamy病)	N-Acetylgalactosamine 4-sulfatase (arylsulfatase B)	常染色体性 劣性遺伝	2.0	米国で2006 年6月承認、 日本で2008 年4月承認	○	
VII型	ムコ多糖症 VII 型 (Sly病)	β -Glucuronidase	常染色体性 劣性遺伝	2.0	米国で治験 開始か?	○	

そのような中、日本におけるムコ多糖症のスクリーニングの研究は、1990年代より厚生省の班研究などにおいて大学における研究のひとつとして岐阜大学と大阪市立大学を中心に行われてきた。

3. 方法

a. 異常代謝物質 (ムコ多糖) を検出する方法
(1) 尿中ムコ多糖の検出

最も古くから行われているものに、CTAB (セタブロン: セチルトリメチルアンモニウムブロマイド) やCPC (セチルピリミジウムクロライド) による混濁反応がある。ムコ多糖体がこれらの試薬と反応し、塩を作って析出する

ことによる定性反応である。感度はあまりよくないので、現在では診断の目的としては使われていない。ジメチルメチレンブルー (DMB) を用いた呈色反応²⁾ は、試薬を加えるだけでムコ多糖と反応して桃色を呈する。手技的に容易であり定量性もある。しかし、この呈色反応は試薬濃度、pH、反応時間により容易に変動するため標準化して定量することが難しい。

尿中のムコ多糖は、正常者においても存在するうえ量も変動することから、部分尿を用いた定性反応や簡易定量法では正常者と患者とを明確に識別することは困難である。デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸といった種類のムコ多糖が多くの割合で排泄されていること

が患者識別に重要である。我々はコンドロイチナーゼによる酵素消化を検体に施すことにより、これらのムコ多糖を特異的に検出しようとしている³⁾。

(2) 血中ムコ多糖の検出

血液ろ紙が現行のマス・スクリーニングで用いられていることから、これを使って血中のムコ多糖を検出してスクリーニングする方法が岐阜大学とセントルイス大学を中心に研究されている⁴⁾。血中のムコ多糖を酵素分解により二糖に分解し、これをタンデム質量分析計により検出する方法である。デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸のそれぞれのムコ多糖分画を検出できるため、正常者との識別も可能である。しかし、手間と感度、費用にまだ改良点が残る。

b. 酵素活性の欠損を発見する方法

(1) 蛍光基質による測定⁵⁾

従来のライソゾーム酵素の活性測定に用いられていた4-メチルウンベリフェロン (4-MU) の蛍光基質を用い、血液ろ紙を材料にして測定する方法である。安価であり、手技も容易である。

(2) 酵素蛋白の検出

ムコ多糖症Ⅱ型で欠損するイズロン酸 2-スルファターゼ酵素の測定は、上記の4-MU基質による測定では2段階の反応を必要とするため煩雑となるので、抗体を用いたELIA法による測定が考案されている。しかし、抗体を用いた測定方法は、酵素蛋白が多く存在するような変異は見逃される危険がある。

(3) タンデム質量分析計による測定⁶⁾

血液ろ紙検体を特殊な基質と反応させ、酵素活性により生ずる産物をタンデム質量分析計にて測定する方法である。目的とする複数の酵素活性を一度に測定することができる。

4. 対象と対象疾患

対象を全ての新生児とするか、あるいは希望者のみにするかという問題がある。現行の新生児マス・スクリーニングは、全ての新生児に行

われている。しかし、ムコ多糖症の場合は、治療の効果が完全でなく画一的でもないことから、全ての新生児を対象とするにはよりきめ細かなフォローアップ体制の準備を必要とする。

対象疾患としても、酵素補充療法ができる疾患に限るべきか、全てのムコ多糖症を対象とするかという問題がある。全てのムコ多糖症をスクリーニングした場合には、治療法がない疾患も診断されることになる。すなわち、これは治療法の無い疾患の発症前診断と同じであることから、十分な医学的、心理的サポート体制が必要である。また、酵素補充療法が可能である疾患の場合においても、早期治療が完全に病を治癒させるものではないことから、慢性疾患としてのサポート体制の充実が望まれる。特に、知能障害を食い止めることは困難であろうと推測されるため、長期のケア体制を充実させなければいけない。

5. 利益と不利益

a. 個人的利益と不利益

早期に診断され早期に治療できることは、大きな恩恵である。しかし、病型によっては治療に関わらず知能障害が進行することが推測される。このことは、すなわち生命予後はよくなるものの介護の期間がより長くなり、家族の負担が大きくなる。他方、治療法がない病型の場合には、生まれて直ぐに苦痛が始まるわけであり、親子間、家族間の精神的変化に対する何らかのサポートが必要となるであろう。

ムコ多糖症は、その他の先天生代謝異常症と同様に遺伝性の疾患であることから、患者の発見は、すなわちその家系における遺伝性疾患の存在を意味するものである。特に、ムコ多糖症Ⅱ型は、そのほかのムコ多糖症が常染色体性劣性遺伝形式であるのに対しX-連鎖性劣性遺伝形式であることから、患者の発見は姉が保因者であるかも知れないことや母方の親族にも患者発生の可能性を示唆するものである。他方、次子の発症リスクへの対処を早期に考えることができることは、メリットと考えられるかもしれない。出生前診断という方法が選択されるかも

しれないし、場合によっては次子を持たないという選択が生じるかもしれない。これらのことについて、遺伝カウンセリング体制の整備が必要であることは言うまでも無い。

b. 社会的利益と不利益

酵素補充療法のみを考えた場合には、医療費としては不利益のほうが多いと想像される。発症前に治療を始めた場合には、発症後に治療を始めるよりも長い期間の医療費を必要とするし、寿命が延びる分にもより多くの医療費が必要となる。特に、知能障害を発症する場合においては、より長期の介護も必要となる。しかしながら、早期治療がより良い治療効果を発揮することは明らかであることから、早期治療は行うべきである。したがって、造血幹細胞移植による治療をできるだけ早い時期に施行すべきではないかと思われる。表2に酵素補充療法と造血幹細胞移植治療の利点、欠点をまとめた。近年、造血幹細胞移植の技術は進歩し、移植による死亡も激減している。成功すれば、毎週点滴治療に通院することもなく、医療費もさほどかからない。効果についても両治療法に大きな差は認められない。スクリーニングで診断されれば直ちに酵素補充療法を開始し、その間に適切なド

ナーが見つければ速やかに造血幹細胞移植へ移行するのが理想的な治療法ではないかと思われる。

6. マス・スクリーニングにおけるインフォームドコンセント

現行の新生児マス・スクリーニングにおいて、陽性とされて呼び出されたときの両親の驚きは当然であるが、ほとんどの親は「新生児マス・スクリーニングを行った」ということを認識していないのが現状である。説明を受けているはずであるが、ほとんどの人は覚えていない。現行の疾患においては、治療すればほぼ健康な子供と同様の社会生活を送れ、ほぼ正常に成人することができることから、今まで大きな問題は起こらなかったものと想像される。しかし、ムコ多糖症においては治療を行っても障害が生じてくる可能性があり、治療方法も毎週の点滴や造血幹細胞移植といった厳しい治療であることから、十分なインフォームドコンセントの手続きを取らなければいけないであろう。

7. 考 察

方法においては、材料として尿と血液が挙げられるが、現行のスクリーニング体制に乗って血液ろ紙を使用することが現実的であろう。ムコ多糖を検出する方法は、感度が充分でないと異常ムコ多糖を見逃す可能性がある。酵素活性の測定は、活性が無いものを「ある」と判断されることは起こりがたいと想像されることから、患者を見逃すリスクは少ないと考えられる。さらに、ムコ多糖を検出する方法では、治療ができない病型のものも診断されることになる。対象疾患を全てのムコ多糖症とした場合には、社会的コンセンサスやインフォームドコンセントといった問題がより重要となるであろう。

最近、ムコ多糖症やその他のライソゾーム病のスクリーニングに対して、患者や患者家族の意見をまとめた論文がいくつか出されている⁷⁾。これはすなわち、ムコ多糖症のスクリーニングを誰しもが是とは感じていないということであろう。当該者に聞いてみないと分からないので

表2. 酵素補充療法と造血幹細胞移植の比較

	酵素補充療法	造血幹細胞移植
効果	肝臓、呼吸器、皮膚、靭帯には効果あり 骨、脳には効果なし	肝臓、呼吸器、皮膚、靭帯には効果あり 骨、脳には効果なし
安全性	アレルギー反応 生命を脅かすことは無い	移植関連反応 ときに生命の危険あり
苦痛	毎週点滴を行わなければいけない	移植時には多くの苦痛があるが、その後は無い
利便性	診断されれば直ぐに治療を開始できる 週1回の通院が生涯必要である	ドナーが見つかるまで待たなければいけない 数ヶ月の入院を必要とするが、その後は無し
費用	生涯高価な薬剤を必要とするため、高額医療が続く	移植に対する費用のみ

ある。これらの論文の結果は、治療効果がある場合には90%以上の人が新生児スクリーニングを望んでおり、効果がほとんどないまたは治療法がない場合であっても80%以上の人が望んでいた。そして、スクリーニングを受けたいという最も大きな理由は、診断の遅れによる苦痛を避けたいというものであった。

日本においては、ごく最近まで痛のような予後不良と思われる病気は本人に伝えないという習慣があった。医師は、患者に不利益になると判断すれば患者に情報を伝えなかった。パターナリズムの医療である。しかし、今は全ての情報が開示される。社会が成熟して、与えられる情報から選び取る情報の時代になった。治療法も患者自身で選択する。知る権利もあるし、知らないでいる権利もある。ムコ多糖症に対してスクリーニングというオプションは提供すべきであろう。しかし、不十分な認識のうちに全員に行うということは問題であろう。

8. 文 献

- 1) Hobbs JR, Hugh-Jones K, Barrett AJ, Byrom N, Chambers D, Henry K, et al. Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone marrow transplantation. *Lancet* 1981; 2: 709-712.
- 2) De Jong JGN, Heijs WMJ, Wevers RA. Mucopolysaccharidoses screening: dimethyl-methylene blue versus Alcian blue. *Ann. Clin. Biochem.* 31: 267-271, 1994.
- 3) 田中あけみ, 梶田知子, 藤本昭榮, 他. 尿濾紙を用いた先天性ムコ多糖症のスクリーニング: コンドロイチナーゼ A/C 消化・DMB-マイクロプレート法. *日本マス・スクリーニング学会誌* 8: 29-35, 1998.
- 4) Oguma T, Tomatsu S, Montano AM, Okazaki O. Analytical method for the determination of disaccharides derived from keratan, heparan, and dermatan sulfates in human serum and plasma by high-performance liquid chromatography/turbionspray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 368: 79-88, 2007.
- 5) Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Diagnosis of alpha-L-iduronidase deficiency in dried blood spots on filter paper: the possibility of newborn diagnosis. *Clin Chem.* 47: 780-1, 2001.
- 6) Li Y, Scott CR, Chamoles NA, Ghavami A, Pinto BM, Turecek F, Gelb MH. Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin Chem.* 50: 1785-96, 2004.
- 7) Hayes IM, Collins V, Sahhar M, Wraith JE, Delatycki MB. Newborn screening for mucopolysaccharidoses: opinions of patients and their families. *Clin Genet.* 71: 446-50, 2007.

受付日: 平成20年12月8日

臍帯血移植の今後

Future prospective of cord blood transplantation

加藤 俊一
KATO Shunichi

臨床血液学 新たなエビデンスの実践に向けて Key words 臍帯血移植 臍帯血バンク 造血幹細胞移植

臍帯血移植は骨髄移植、末梢血幹細胞移植に次ぐ第3の造血幹細胞移植として臨床応用され、最近では非血縁者間造血幹細胞移植においては骨髄移植とほぼ同数の移植が行われるようになってきている。本稿においては、造血幹細胞移植全体と臍帯血移植の現況を踏まえながら、臍帯血移植の今後の展望を行いたい。

● 臍帯血移植の歴史

臍帯血中に未分化で増殖能力に富む造血幹細胞が豊富に含まれ、1人の胎盤から得られる臍帯血によって、骨髄移植と同様に造血を回復させる可能性があることが報告されたのは1980年代半ばのことである。多くの移植医はその実用性に当初懐疑的であったが、1988年にフランスのGluckmanらによって最初の同胞間臍帯血移植が実施され、造血幹細胞移植の細胞源としての可能性が実証さ

れて以来、1990年代前半に血縁者間での移植数が徐々に増加していった¹⁾。1990年代後半には各国に臍帯血バンクが設立され、血縁者から非血縁者へとドナーの拡大が図られたことにより移植数は急速に増加した。

● 臍帯血移植の特徴

非血縁者間骨髄移植と比較した非血縁者間臍帯血移植の特徴は表1に示すとおりであるが、主な点は以下のようにまとめられる。

表1 非血縁者間骨髄移植と非血縁者間臍帯血移植の比較

	非血縁者間骨髄移植	非血縁者間臍帯血移植
ドナーへの負担・リスク	あり	なし
ドナーコーディネート	数週～数ヵ月	なし
申込みから移植までの期間	数ヵ月	数週
移植細胞数の確保	十分量を確保可能	量が不足することもある
HLA適合	抗原～アレル一致が原則	1～2抗原不一致でも可能
生着速度	同胞間骨髄移植と同等	遅延(とくに血小板)
急性GVHD	重症化することがある	軽症～中等症で経過
慢性GVHD	同胞間骨髄移植よりも多い	同胞間骨髄移植とほぼ同等
感染症	同胞間骨髄移植よりやや多い	増加する

東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学 教授

1. ドナーの負担がない

骨髄採取や末梢血幹細胞採取においては全身麻酔やG-CSFの投与、アフエレーシスなどの身体的負担とリスクがあり、そのために数日間の入院を要するなどの社会的負担があるのに対して、臍帯血採取は通常の分娩過程の中で母子のいずれに対しても新たな負担やリスクが生じない点がメリットである。

2. 迅速性

移植医療側のメリットとしては、非血縁者間骨髄移植では数ヶ月のコーディネート期間を必要とするために、最善の状態で移植を実施できないことがありうるのに対して、臍帯血移植においては移植が必要な場合に迅速に臍帯血が入手可能であるという点があげられる。

3. 重症GVHD頻度の低さとHLA不適合の許容

骨髄移植や末梢血幹細胞移植と比較すると、II度の急性GVHDの頻度は必ずしも差はないが、臍帯血移植ではIII～IV度の最重症GVHDの頻度が低く、また発症してもコントロール可能なことが多い。そのため急性GVHDが死因となることは少なく、HLAの適合度においても1～2抗原不一致の組み合わせでも移植が可能となっている。

慢性GVHDについても、非血縁者間骨髄移植の約半分の頻度となっている。

4. 生着不全と遅延

臍帯血移植の最大の欠点は生着不全の頻度が高く、生着までの期間が長いことである。白血病などの腫瘍性疾患においては10～15%が生着不全となっており、非腫瘍性疾患においては疾患の種類によって異なるが、10～50%程度の生着不全が起りえることから、移植としての安全性と安定性において問題となっている。

5. 感染症などの合併症

生着不全や生着遅延の結果として、さらには臍帯血リンパ球の未熟性に起因する免疫能回復遅延により細菌、真菌、ウイルスなどの感染症の頻度が高く、死因の多くを感染症が占めている。

6. バンク運営費用

骨髄バンクがドナーHLA情報と提供意思のバンキングであるのに対し、臍帯血バンクは移植細胞のバンキングであるため、採取、分離、保存、検査、運搬などに要する経費が膨大である。国内の臍帯血バンクはすべて赤字で運営を行っているのが現状である。



わが国における造血幹細胞移植の実施状況

図1はわが国における同種造血幹細胞移植の年次別推移(1991～2005年)を示したものである。血縁者間移植については日本造血細胞移植学会の全国集計²⁾、非血縁者間移植については骨髄バンク³⁾と日本さい帯血バンクネットワーク⁴⁾の公表データを用いた。非血縁者間移植については正確な数字であるが、血縁者間移植についてはすべてが捕捉されているとは言えないが、おおよその傾向が分かるものとして同一のグラフ内に示したものである。

図2は非血縁者間骨髄移植と非血縁者間臍帯血移植のみについて1993～2007年までの推移を示したものであるが、2003年以降は両者の移植数がほぼ同等となっている。図3は非血縁者間臍帯血移植を受けた症例を小児(16歳未満)、若年成人(16～49歳)、高齢成人(50歳以上)に大別して、その推移を示したものであるが、2000年頃まではほとんどの移植例が小児であったものが、2000年頃から若年成人での移植が増加し始め、2003年頃から高齢成人での移植が急速に増加していることが分かる。

さらに、小児、若年成人、高齢成人のそれぞれ

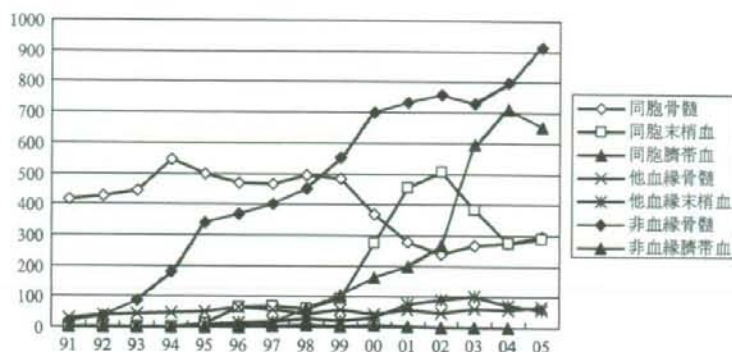


図1 わが国における同種造血幹細胞移植の年次別推移(文献2より)

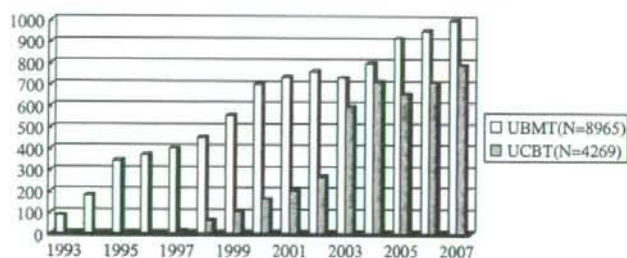


図2 わが国における非血縁者間骨髄移植と非血縁者間臍帯血移植の年次別推移(文献3, 4より)

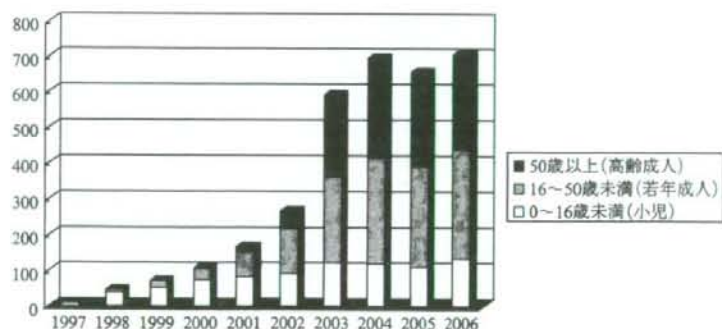


図3 非血縁者間臍帯血移植における小児と成人別移植数推移

について年齢区分を細かくしてみたものが図4である。小児においては5歳以上では2000年以降はほぼ同じ数で推移しているのに対して、5歳未満の乳幼児ではまだ増加傾向が続いている。若年成人では年齢が高い世代ほど増加傾向が目立っている。高齢成人では50歳代が最も多く、60歳代でも年間100例前後の移植が行われている。

このような成人における臍帯血移植の増加現象はわが国に特徴的なことであり、東京大学医科学研究所における若年成人臍帯血移植の好成績、虎の門病院における高齢者への骨髄非破壊的移植の導入などによるところが大きい。そしてその背景にはいわゆる団塊の世代が50歳台となり、白血病、骨髄異形成症候群、悪性リンパ腫などの好発年齢

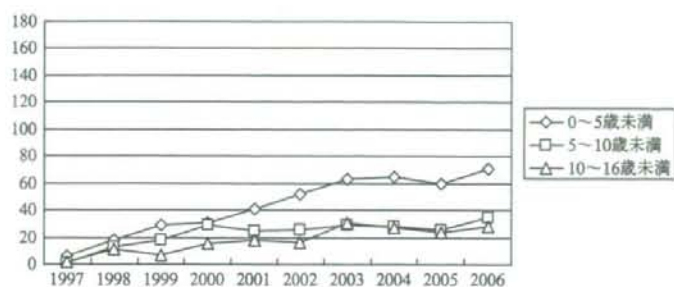


図4a 小児における年齢別非血縁者間臍帯血移植数の推移

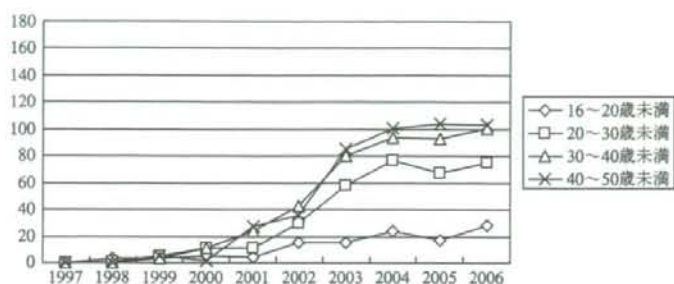


図4b 若年成人における年齢別非血縁者間臍帯血移植数の推移

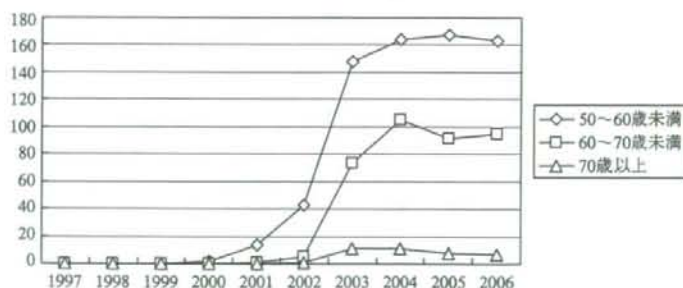


図4c 高齢成人における年齢別非血縁者間臍帯血移植数の推移

となったことがある。

また、骨髄バンクと比較して移植までの期間が短いことに加えて、患者からバンクへの費用負担がほとんどないという点も見逃せない要因となっているものと思われる。



臍帯血移植の成績

わが国における非血縁者間臍帯血移植の最新の

成績は、日本さい帯血バンクネットワークのホームページに掲載されている⁴⁾。ここでは概要を紹介する。

1. 生 着

保存時の有核細胞数、CD34陽性細胞数、CFUのいずれもが生着速度と相関し、より強い相関を示したのはCD34とCFUであった。有核細胞としては $2 \times 10^7/\text{kg}$ 以上、CD34陽性細胞数として0.5

$\times 10^5/\text{kg}$ 以上のユニットを選択することが望ましい。

2. GVHD

Ⅱ度以上の急性GVHD発症と関連したのはHLA適合度であり、アレル不一致数が増すにつれてⅡ度以上の急性GVHDの頻度が高くなっていった。

3. 生存

生存に最も影響していたのは移植時の疾患の状態であり、他の造血幹細胞移植と同様である。移植された有核細胞数と生存との間に相関は認められなかった。HLA適合度は小児の非腫瘍性疾患と急性リンパ性白血病において生存と有意に相関をしていたが、小児急性骨髄性白血病と成人急性白血病では相関が認められなかった。

今後の課題

臍帯血移植の最大の課題は、移植方法として安定したものにするために、いかに生着不全を少なくできるかという点である。

1. 保存細胞数の増加

生着速度と生着不全に最も強く相関するのは、移植された有核細胞数、CD34陽性細胞数、コロニー形成細胞数などである。日本さい帯血バンクネットワークにおいては当初 3×10^6 個から開始された保存臍帯血有核細胞数の下限を徐々に引き上げ、現在 8×10^6 個以上としているが、将来的には 10×10^6 個まで引き上げることが計画されている。

2. 複数臍帯血移植

ミネソタのWagnerらによる複数臍帯血移植は生着不全の対策として開始され、生着不全の減少のほか、急性GVHDの増加と白血病再発率の減少などが報告されている⁵⁾。Wagnerらの研

究では、移植された2つの臍帯血のいずれか一方のみが移植後1ヵ月までに生着することが判明しているが、いずれの臍帯血が生着するかを予測できる因子(有核細胞数、CD34陽性細胞数、T細胞数、HLA適合度など)については分かっていない。

わが国でも厚生労働省の研究班(「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」)により臨床試験が行われており、その結果により正式に保険診療として位置づけられる可能性がある。

3. 骨髄内移植

骨髄移植の開発の歴史において、骨髄は当初患者の骨髄中に直接注入されていたが、その後、経静脈的に輸注する方法が普及した。臍帯血移植においては経静脈的な投与により行われているが、臍帯血の骨髄内移植の試みがミネソタのWagnerら、イタリアのFrassoniらによって開始されている⁶⁾⁷⁾。

Wagnerらは2つの臍帯血の一方を従来の経静脈的に、もう一方を骨髄内に輸注するという複数臍帯血移植により検討した。しかし、予想に反して経静脈的に投与した臍帯血が生着することが大多数であったため、彼らの臨床試験は中止された。

Frassoniらは1つの臍帯血を直接腸骨内に輸注して生着の有無を検討している。現時点では、臍帯血の骨髄内移植が可能であることは判明しているが、生着不全を減少させられるかどうかについては、症例数の増加を待って判断する必要があると思われる。

4. 臍帯血幹細胞の体外増幅

自己複製能をもった臍帯血幹細胞を体外で増幅する研究は数多くあり、いくつかのグループが臨床応用を試みたが、真の幹細胞を増幅することに成功したという報告はまだない。サイトカインのみで幹細胞の体外増幅が可能なのか、stroma細胞との共培養によるべきなのかなど、今後の重要な検討課題として残っている。

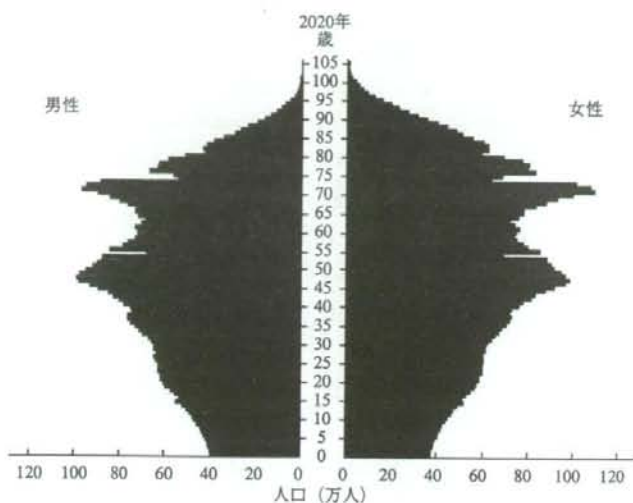


図5 2020年におけるわが国の人口ピラミッド予想(文献8より)

5. 質の高い臨床研究による課題の検討

このような課題についての検討は、十分に計画された多施設共同臨床研究により実施されるべきものである。現在上記の厚生労働省研究班(主任研究者：加藤俊一)においては、以下のような多施設共同臨床研究が進行中である。

- ・複数臍帯血同時移植の臨床第Ⅱ相試験(分担研究者：甲斐俊朗)

- ・成人における骨髄破壊的前処置による非血縁者間臍帯血移植の移植方法に関する研究(分担研究者：高橋 聡)

- ・小児急性白血病に対するリン酸フルダラビンを用いた前処置の安全性・有効性に関する検討(分担研究者：磯山恵一)

6. 品質評価と精度管理

わが国の保険診療においては臍帯血移植は「移植療法」の中に位置づけられているため、移植される細胞の品質評価や精度管理については比較的緩やかな基準で実施されている。輸血用の血液製剤と同等の基準をあてはめることが可能であるか、あるいは妥当であるかという問題は、国際的

にも現在検討が進められているところである。

今後の臍帯血移植と移植数の予測

造血幹細胞移植の需要は今後もしばらくは増加の傾向が続くものと思われる。図5は2020年のわが国における人口ピラミッドの推測であるが、現在の団塊の世代が70歳前後となり、団塊ジュニア世代が45歳前後となる⁸⁾。したがって、高齢者における造血幹細胞移植が全体の半数程度を占める時代が今後も続くものと思われる。

骨髄バンクにおいては今後末梢血幹細胞移植を開始することとなると思われ、非血縁者間造血幹細胞移植は骨髄移植、末梢血幹細胞移植、臍帯血移植とさらに多様性が増すものと思われる。そのように多様化する非血縁者間造血幹細胞移植の中で、臍帯血移植の比率がどの程度を占めながら推移するかを予測することは容易ではない。

骨髄バンクにおけるコーディネイト期間が大幅に短縮されれば、安定した移植としての骨髄移植を選択することが多くなる可能性がある。一方で、臍帯血移植の治療技術に大きな進歩がみられれば、迅速に実施可能な臍帯血移植がより多く選択

される可能性もある。

このような需要の変化とは別により安全性の高い細胞治療が求められるようになり、国際的に通用するGMP (Good Manufacturing Practice) 基準による細胞処理や保存について新しい枠組みが必要となると思われる。従来の「医薬品」としてではなく、「細胞治療」というカテゴリーの中で安全性の基準を議論していくべきものと考えらる。

おわりに

臍帯血移植の歴史と特徴、成績、実施状況などを踏まえて今後の臍帯血移植の発展について考察してみた。造血幹細胞移植としての臍帯血移植に加え、臍帯血や胎盤組織を用いての再生医療への応用についても研究が進められているところである。少子高齢化の時代における医療の発展を期待して稿を終わりたい。

文 献

- 1) 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* 321 : 1174-1178, 1989.
- 2) 日本造血細胞移植学会・平成18年度全国調査報告書。2007年3月。
- 3) 骨髄移植推進財団・マンスリーレポート。2008年1月。
- 4) 日本さい帯血バンクネットワーク・ホームページ。 <https://www.j-cord.gr.jp/>
- 5) Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, et al : Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 105 : 1343-1347, 2005.
- 6) Brunstein CG, Wagner JE : Umbilical cord blood transplantation and banking. *Annu Rev Med* 57 : 403-417, 2006.
- 7) Castello S, Podesta M, Menditto VG, et al : Intra-bone marrow injection of bone marrow and cord blood cells : an alternative way of transplantation associated with a higher seeding efficiency. *Exp Hematol* 32 : 782-787, 2004.
- 8) 国立社会保障・人口問題研究所・ホームページ。 <http://www.ipss.go.jp/>

blood

2009 113: 1631-1638
Prepublished online Dec 22, 2008;
doi:10.1182/blood-2008-03-147041

Disease-specific analyses of unrelated cord blood transplantation compared with unrelated bone marrow transplantation in adult patients with acute leukemia

Yoshiko Atsuta, Ritsuro Suzuki, Tokiko Nagamura-Inoue, Shuichi Taniguchi, Satoshi Takahashi, Shunro Kai, Hisashi Sakamaki, Yasushi Kouzai, Masaharu Kasai, Takahiro Fukuda, Hiroshi Azuma, Minoko Takanashi, Shinichiro Okamoto, Masahiro Tsuchida, Keisei Kawa, Yasuo Morishima, Yoshihisa Kadera, Shunichi Kato and for the Japan Marrow Donor Program and the Japan Cord Blood Bank Network

Updated information and services can be found at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/full/113/8/1631>

Articles on similar topics may be found in the following *Blood* collections:

- Transplantation (1350 articles)
- Free Research Articles (588 articles)
- Myeloid Neoplasia (27 articles)
- Lymphoid Neoplasia (39 articles)
- Clinical Trials and Observations (2511 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/subscriptions/index.dtl>



Disease-specific analyses of unrelated cord blood transplantation compared with unrelated bone marrow transplantation in adult patients with acute leukemia

Yoshiko Atsuta,¹ Ritsuro Suzuki,¹ Tokiko Nagamura-Inoue,² Shuichi Taniguchi,³ Satoshi Takahashi,⁴ Shunro Kai,⁵ Hisashi Sakamaki,⁶ Yasushi Kouzal,⁷ Masaharu Kasai,⁸ Takahiro Fukuda,⁹ Hiroshi Azuma,¹⁰ Minoko Takanashi,¹¹ Shinichiro Okamoto,¹² Masahiro Tsuchida,¹³ Keisei Kawa,¹⁴ Yasuo Morishima,¹⁵ Yoshihisa Kodaera,¹⁶ and Shunichi Kato,¹⁷ for the Japan Marrow Donor Program and the Japan Cord Blood Bank Network

¹Department of Hematopoietic Stem Cell Transplantation Data Management, Nagoya University School of Medicine, Nagoya; ²Department of Cell Processing & Transfusion, Research Hospital, Institute of Medical Science, University of Tokyo, and Tokyo Cord Blood Bank, Tokyo; ³Department of Hematology, Toranomon Hospital, Tokyo; ⁴Department of Molecular Therapy, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo; ⁵Department of Transfusion Medicine, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya; ⁶Division of Hematology, Tokyo Metropolitan Komagome Hospital, Tokyo; ⁷Department of Transfusion Medicine, Tokyo Metropolitan Fuchu Hospital, Tokyo; ⁸Department of Hematology, Sapporo Hokuyu Hospital, Sapporo; ⁹Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit, National Cancer Center Hospital, Tokyo; ¹⁰Hokkaido Red Cross Blood Center, Sapporo; ¹¹Japanese Red Cross Tokyo Blood Center, Tokyo; ¹²Division of Hematology, Department of Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo; ¹³Ibaraki Children's Hospital, Mito; ¹⁴Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health, Izumi; ¹⁵Aichi Cancer Center Hospital, Nagoya; ¹⁶BMT Center, Japanese Red Cross Nagoya First Hospital, Nagoya; and ¹⁷Department of Cell Transplantation & Regenerative Medicine, Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan

We made a disease-specific comparison of unrelated cord blood (CB) recipients and human leukocyte antigen allele-matched unrelated bone marrow (BM) recipients among 484 patients with acute myeloid leukemia (AML; 173 CB and 311 BM) and 336 patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL; 114 CB and 222 BM) who received myeloablative transplantations. In multivariate analyses, among AML cases, lower overall survival (hazard ratio [HR] = 1.5; 95% confidence interval [CI], 1.0-2.0, $P = .028$) and

leukemia-free survival (HR = 1.5; 95% CI, 1.1-2.0, $P = .012$) were observed in CB recipients. The relapse rate did not differ between the 2 groups of AML (HR = 1.2; 95% CI, 0.8-1.9, $P = .38$); however, the treatment-related mortality rate showed higher trend in CB recipients (HR = 1.5; 95% CI, 1.0-2.3, $P = .085$). In ALL, there was no significant difference between the groups for relapse (HR = 1.4, 95% CI, 0.8-2.4, $P = .19$) and treatment-related mortality (HR = 1.0; 95% CI, 0.6-1.7, $P = .98$), which contributed to similar

overall survival (HR = 1.1; 95% CI, 0.7-1.6, $P = .78$) and leukemia-free survival (HR = 1.2; 95% CI, 0.9-1.8, $P = .28$). Matched or mismatched single-unit CB is a favorable alternative stem cell source for patients without a human leukocyte antigen-matched related or unrelated donor. For patients with AML, decreasing mortality, especially in the early phase of transplantation, is required to improve the outcome for CB recipients. (Blood. 2009;113:1631-1638)

Introduction

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) with bone marrow (BM) or peripheral blood, the curative treatment of choice for acute leukemia, is limited by the inadequate supply of human leukocyte antigen (HLA)-identical related donors. Bone marrow from HLA-matched unrelated donors has been a major alternative graft source.¹⁻³ Umbilical cord blood (CB), an alternative stem cell source to BM or peripheral blood stem cells, has been used primarily in children,⁴⁻¹⁰ but its use in adults is increasing.^{11,12}

Clinical comparison studies of cord blood transplantation (CBT) and bone marrow transplantation (BMT) for leukemia from unrelated donors in adult recipients showed comparable outcomes.¹¹⁻¹³ Recipients of CBT showed delayed neutrophil recovery and lower incidence of acute graft-versus-host disease (GVHD).¹¹⁻¹³ Overall treatment-related mortality (TRM) was reported to be similar¹² or higher¹¹ compared with HLA-matched BM. Acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL) are different disease entities that require different chemotherapy regimens for treatment. However, previous comparison

studies have included both diseases because of limitation in the number of CBTs given to adults.

In addition, the study periods of previous studies encompass the pioneering period of CBT, when the general practice was to use these grafts in patients in whom there were no other curative options and when the relevance of cell dose and HLA matching had not yet been recognized.^{6,7,14}

Accumulation of a larger number of CBT results enabled us to make a controlled comparison with unrelated BMTs. To avoid the inclusion of the pioneering period of CBT, the subjects were limited to those who received transplantations in and after 2000.

Methods

Collection of data and data source

The recipients' clinical data were provided by the Japan Cord Blood Bank Network (JCBBN) and the Japan Marrow Donor Program (JMDP).¹⁵

Submitted March 21, 2008; accepted November 14, 2008. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, December 22, 2008; DOI 10.1182/blood-2008-03-147041.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2009 by The American Society of Hematology

Peripheral blood stem cell donation from unrelated donors is not permitted in Japan. All 11 CB banks in Japan are affiliated to JCBBN. Both JCBBN and JMDP collect recipients' clinical information at 100 days after transplantation. Patients' information on survival, disease status, and long-term complications, including chronic GVHD and second malignancies, are renewed annually by follow-up forms. This study was approved by the data management committees of JMDP and JCBBN.

Patients

Between January 2000 and December 2005, a total of 1690 adult patients at least 16 years of age with acute leukemia (999 AML, 261 CB and 738 BM; and 691 ALL, 178 CB and 513 BM) received first HSCT with myeloablative conditioning either CB or BM from unrelated donors. Of these, patients who received a single CB unit with 0 to 2 HLA mismatches, or HLA-A, -B, -C, and DRB1 allele-matched BM from unrelated donors were analyzed. HLA matching of CB was performed using low-resolution molecular typing methods for HLA-A and -B, and high-resolution molecular typing for HLA-DRB1. Of 1023 BM recipients with complete HLA high-resolution data, the following recipients with HLA HLA-A, -B, -C, and DRB1 allele mismatches were excluded: 306 recipients with 1 of 8 mismatches (39 for HLA-A, 6 for HLA-B, 137 for HLA-C, and 124 for HLA-DRB1), 150 recipients with 2 of 8 mismatches (36 for 2 class I antigens, and 114 for class I and class II antigens), 33 recipients with 3 of 8 mismatches, and 1 recipient with 4 of 8 mismatches. Of 390 recipients of CB with complete HLA data, 95 recipients with 3 mismatches and 8 patients with 4 mismatches were excluded. A total of 484 patients with AML (173 CBTs and 311 BMTs) and 336 patients with ALL (114 CBTs and 222 BMTs) were the subjects for the analyses. Eighty-five centers performed 287 CBTs analyzed in this study, and 114 centers performed 533 BMTs.

Definitions

Neutrophil recovery was defined by an absolute neutrophil count of at least 500 cells/mm³ for 3 consecutive points; platelet recovery was defined by a count of at least 50 000 platelets/mm³ without transfusion support. Diagnosis and clinical grading of acute GVHD were performed according to the established criteria.¹⁶ Relapse was defined as a recurrence of underlying hematologic malignant diseases. Treatment-related death was defined as death during a continuous remission. Leukemia-free survival (LFS) was defined as survival in a state of continuous remission.

Statistical analysis

Separate analyses were performed for AML and ALL. Descriptive statistical analysis was performed to assess patient baseline characteristics, diagnosis, disease classification, disease status at conditioning, donor-patient ABO mismatches, preparative regimen, and GVHD prophylaxis. The 2-sided χ^2 test was used for categorical variables, and the 2-sided Wilcoxon rank sum test was used for continuous variables. Cumulative incidence curves were used in a competing-risks setting to calculate the probability of neutrophil and platelet recovery, acute and chronic GVHD, relapse, and TRM.¹⁷ For neutrophil and platelet recovery, death before neutrophil or platelet recovery was the competing event; for GVHD, death without GVHD and relapse were the competing events; for relapse, death without relapse was the competing event; and, for TRM, relapse was the competing event. Gray test was used for group comparison of cumulative incidence.¹⁸ Overall survival (OS) and LFS were calculated using the Kaplan-Meier method. The log-rank test was used for group comparisons. Adjusted comparison of the stem cell source on OS and LFS was performed with the use of the Cox proportional-hazards regression model. For other outcomes, the Fine and Gray proportional-hazards model for redistribution of a competing risk was used.¹⁹ Adjusted probabilities of OS and DFS were estimated using the Cox proportional-hazards regression model, with consideration of other significant clinical variables in the final multivariate models. The variables considered were the patient's age at transplantation, patient's sex, donor-patient sex mismatch, donor-patient ABO mismatch, disease status at conditioning, and t(9;22) chromosome abnormality or others for ALL, cytogenetic information and French-American-British (FAB) classification

of M5/M6/M7 or others for AML, the conditioning regimen, and the type of prophylaxis against GVHD. Factors differing in distribution between CB and BM recipients ($P < .10$) and factors known to influence outcomes (such as patient age at transplantation and chromosome abnormalities and FAB classification of leukemia) were included in the final models. Variables with more than 2 categories were dichotomized for the final multivariate model. The cutoff points of the variables were chosen to make optimal use of the information, with the proviso that smaller groups contain at least 20% of the patients. Variables were dichotomized as follows: patient age greater or younger than 45 years at transplantation, female donor to male recipient donor-recipient sex mismatch versus others for donor-recipient sex matching, donor-recipient ABO major mismatch versus others for ABO matching, M5/M6/M7 FAB classification versus others for classification of AML, chromosome abnormality other than favorable abnormalities for cytogenetics of AML, cyclophosphamide and total body irradiation (TBI) or busulfan and cyclophosphamide or others for conditioning regimen of AML, cyclophosphamide and TBI, or others for conditioning regimen of ALL, and cyclosporine-based versus tacrolimus-based prophylaxis against GVHD. Disease status at transplantation was categorized as first complete remission (1CR), second or later complete remission (2CR), or more advanced disease; which was included in the final model using dichotomized dummy variables. All P values were 2-sided.

The statistical power to detect hazard ratios (HRs) of 2.0 and 1.5 (a regression coefficient equal to 0.6931 and 0.4055, respectively) on Cox regression of the log hazard ratio at a .05 significance level adjusted for event rate were 99% and 78%, respectively, for 484 patients with AML and 97% and 60%, respectively, for 336 patients with ALL. The levels of statistical power for subgroup analyses were as follows: 54% and 22% for 1CR, 51% and 21% for 2CR, 96% and 58% for more advanced in AML patients, 62% and 26% for 1CR, 47% and 20% for 2CR, and 67% and 29% for more advanced in ALL patients.²⁰

Results

Patient characteristics

The characteristics of the patients are shown in Table 1. There was no significant difference in recipients' age at transplantation in AML (median age, CB vs BM = 38 vs 38 years, $P = .61$) and in ALL (median age, CB vs BM = 34 vs 32 years, $P = .29$). The female/male ratio was higher (CB vs BM = 54% vs 38% in AML patients, and CB vs BM = 54% vs 38% in ALL patients, $P < .001$ and $P = .005$, respectively) in CB recipients, resulting in the lower donor-patient sex match rate (CB vs BM = 48% vs 69% in AML patients, and CB vs BM = 46% vs 65% in ALL patients, $P < .001$ and $P = .002$, respectively) in CB recipients. The proportion of ALL patients with Philadelphia chromosome abnormality was higher (CB vs BM = 38% vs 23%) in CB recipients. CB recipients were likely to have more advanced disease status at transplantation (relapse or induction failure, CB vs BM = 47% vs 31% in AML patients, and CB vs BM = 26% vs 19% in ALL patients), and the difference was significant in AML ($P = .003$). HLA-A, -B (low-resolution typing), and -DRB1 (high-resolution typing) was mismatched in 93% of both AML and ALL among CB recipients, whereas HLA -A, -B, -C, and -DRB1 were all genotypically matched for BM recipients. The ABO-matched donor-patient pair proportion was consistently lower for CB (CB vs BM = 34% vs 59% in AML patients and CB vs BM = 32% vs 58% in ALL patients).

A preparative regimen with TBI and cyclophosphamide was used in almost all patients, and cytosine arabinoside was supplemented for CB recipients with AML (36%) in addition to TBI and cyclophosphamide. For GVHD prophylaxis, tacrolimus (CB vs BM = 29% vs 56% in AML patients, and CB vs BM = 37% vs 53% in ALL patients) and

Table 1. Characteristics of recipients of cord blood or bone marrow from unrelated donors in 484 patients with acute myeloid leukemia and 336 patients with acute lymphoblastic leukemia

Characteristic	Acute myeloid leukemia			Acute lymphoblastic leukemia		
	U-CBT	U-BMT	P	U-CBT	U-BMT	P
No. of transplantations	173	311		114	222	
Median patient age at transplantation, y (range)	38 (16-69)	38 (16-60)	.61	34 (16-58)	32 (16-59)	.29
Patient sex, n (%)						
Male	80 (46)	194 (62)	< .001	52 (46)	137 (62)	.005
Female	93 (54)	117 (38)		62 (54)	85 (38)	
Sex matching, n (%)			< .001			.002
Matched	83 (48)	216 (69)		52 (46)	145 (65)	
Male to female	44 (25)	57 (18)		35 (31)	42 (19)	
Female to male	46 (27)	37 (12)		27 (24)	35 (16)	
Unknown	0 (0)	1 (0)		0 (0)	0 (0)	
Disease classification						
AML (French-American-British)			.045			
M0	17 (10)	26 (8)				
M1	30 (17)	38 (12)				
M2	52 (30)	88 (28)				
M3	4 (2)	25 (8)				
M4	27 (16)	55 (18)				
M5	23 (13)	41 (13)				
M6	3 (2)	18 (6)				
M7	2 (1)	5 (2)				
Others/unknown	15 (9)	15 (5)				
Cytogenetics			.042			
Favorable*	19 (11)	66 (21)				
Normal	74 (43)	116 (37)				
Other	57 (33)	95 (31)				
Unknown	23 (13)	34 (11)				
ALL cytogenetics						.022
t(9;22)				43 (38)	52 (23)	
t(4;11)				2 (2)	3 (1)	
Others				22 (19)	51 (23)	
Normal				27 (24)	85 (38)	
Unknown				20 (18)	31 (14)	
Disease status			.003			.33
First CR	50 (29)	130 (42)		63 (55)	130 (59)	
Second or after CR	39 (23)	82 (26)		21 (18)	48 (22)	
Relapse/induction failure	81 (47)	95 (31)		30 (26)	42 (19)	
Unknown	3 (2)	4 (1)		0 (0)	2 (1)	
HLA matching†						
0 mismatched loci	12 (7)			8 (7)		
1 mismatched locus	35 (20)			25 (22)		
2 mismatched loci	126 (73)			81 (71)		
ABO matching			< .001			< .001
Matched	59 (34)	185 (59)		37 (32)	128 (58)	
Minor mismatch	48 (28)	57 (18)		30 (26)	48 (22)	
Major mismatch	37 (21)	59 (19)		24 (21)	41 (18)	
Bidirectional	28 (16)	8 (3)		23 (20)	3 (1)	
Unknown	1 (1)	2 (1)		0 (0)	2 (1)	
Nucleated cells infused per 10 ⁷ /kg, median (range)	2.44 (1.65-5.49)	26.3 (2.10-58.8)	< .001	2.48 (1.51-4.06)	28.2 (2.30-79.0)	< .001
Preparative regimen			< .001			.38
CY + TBI	43 (25)	142 (46)		42 (37)	92 (41)	
CY + CA + TBI	62 (36)	41 (13)		31 (27)	53 (24)	
CY + BU + TBI	7 (4)	36 (12)		3 (3)	5 (2)	
Other TBI regimen	42 (24)	33 (11)		34 (30)	54 (24)	
BU + CY	18 (10)	55 (18)		4 (4)	12 (5)	
Other non-TBI regimen	1 (1)	4 (1)		0 (0)	6 (3)	
GVHD prophylaxis			< .001			< .001
Cyclosporine A + sMTX	103 (60)	131 (42)		65 (57)	100 (45)	
Cyclosporine A ± other	20 (12)	4 (1)		6 (5)	3 (1)	
Tacrolimus + sMTX	34 (20)	168 (54)		26 (23)	106 (48)	
Tacrolimus ± other	15 (9)	5 (2)		16 (14)	11 (5)	
Others	1 (1)	3 (1)		1 (1)	2 (1)	

U-CBT, indicates unrelated cord blood transplantation; U-BMT, unrelated bone marrow transplantation; CR, complete remission; HLA, human leukocyte antigen; CY, cyclophosphamide; CA, cytarabine; BU, oral busulfan; TBI, total body irradiation; and sMTX, short-term methotrexate.

*Favorable abnormal karyotypes are defined as t(8;21), inv16, or t(15;17).

†Number of mismatches was counted among HLA-A, -B (low-resolution typing), and DRB1 (high-resolution typing).