

(functional avidity)を低下させてT細胞レパトアを修飾することにより患者の免疫からエスケープしている。このため、白血病患者ではLAAsに対する末梢性トランスが健常者に比べて強く起こっており、抗白血病免疫が誘導されにくい。一方allo-SCT後には健常ドナーのT細胞免疫が移植されるため、ドナーのナイーブT細胞レパトアの中からLAAsに対して機能的結合性の高いCTLが誘導される可能性が高い。したがって、HLA一致ドナーにとって‘自己’抗原である遺伝子の突然変異や、多型の存在が知られていないLAAsはGvL効果の標的抗原となると考えられる。このことから、allo-SCT後にLAAsワクチンを併用すればより効果的にGvL効果を誘導できる可能性がある。以上の仮説をもとに、我々は白血病細胞が過剰発現している自己抗原の中から、細胞周期調整タンパクであるCDK2由来A24拘束性9merペプチドペプチドがGvL効果の標的抗原になりうるLAAsであることを明らかにしてきた。allo-SCTを施行されたHLA-A24陽性造血器悪性疾患患者を対象として、CDK2ペプチド特異的CTLの誘導の有無をCDK2 peptide/A24 pentamerを用いて検討したところ、17例中6例で移植前に認められなかったCDK2ペプチド特異的CTLが移植後の末梢血中に検出された。この6例は移植後10-73ヶ月間寛解を維持しており全例で移植前にMRDを認めた。今回の検討から、allo-SCT時にMRDを有する白血病患者では、移植時に残存するLDCがドナーのナイーブCD8⁺T細胞を刺激して、移植後CDK2ペプチド特異的CTLを誘導している可能性が示唆された。また今回新たにLDCがGITRLを発現していることが明らかになった。GITRLのレセプターであるGITRはTNFR superfamilyに属し、活性化に伴ってT細胞上で発現が亢進する。マウスではGITR/GITRL結合によってCD4⁺CD25⁺制御性T細胞が抑制され、エフェクターT細胞が活性化するが、ヒトT細胞での役割はこれまで明らかにされていない。一方GITRが恒常的に発現しているヒトNK細胞は、一部の上皮性悪性腫瘍細胞で過剰発現されているGITRLとの結合を介して細胞傷害活性が抑制されることが報

告されている。今回の検討から、LDC上のGITRLはナイーブCD8⁺T細胞上のGITRと結合することによってLAAs特異的CTLのプライミングを阻害し、白血病細胞が患者の抗白血病免疫からエスケープする機序に関与している可能性が示唆された。以上の結果から、allo-SCT前にMRDを有する白血病患者では、allo-SCT後に抗GITR抗体を投与することによってLAAsを標的としたGvL効果をより効果的に誘導出来る可能性があると考えられる。

D. 結論

Allo-SCT前にMRDを有する白血病患者ではallo-SCT後に抗GITR抗体を投与することによって、またMRDを有しない白血病患者ではallo-SCT後にCDK2ペプチドをワクチンとして投与することによってGvL効果を増強できる可能性がある。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Lu X, Kondo Y, Takamatsu H, Ohata K, Yamazaki H, Takami A, Akatsuka Y, Nakao S. CD16+ CD56- NK cells in the peripheral blood of cord blood transplant recipients: a unique subset of NK cells possibly associated with graft-versus-leukemia effect. *Eur J Haematol.* 2008; 81:18-25
- 2) Mochizuki K, Sugimori C, Qi Z, Lu X, Takami A, Ishiyama K, Kondo Y, Yamazaki H, Okumura H, Nakao S. Expansion of donor-derived hematopoietic stem cells with PIGA mutation associated with late graft failure after allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2008;112: 2160-2162
- 3) Takamatsu H, Espinoza JL, Lu X, Qi Z, Okawa K, Nakao S. Anti-moesin antibodies in the serum of patients with aplastic anemia stimulate peripheral blood mononuclear cells to secrete TNF-alpha and IFN-gamma. *J Immunol.* 2009;182: 703-710

学会発表

- 1) Kondo Y, Katagiri T, Nakao S : GITR Ligand on Leukemic Myeloid Dendritic Cells Suppresses Induction of Leukemia-Associated Antigen-Specific CTLs from Naive CD8⁺ T Cells.

(2008年米国血液学会総会)

- 2) 近藤恭夫, 片桐孝和, 祁志榮, 盧緒章, 大畑欣也, 齊藤千鶴, 宗本早織, 石山謙, 島樋茂, 山崎宏人, 杉森尚美, 高見昭良, 奥村廣和, 中尾眞二 : 白血病細胞由来樹状細胞上の GITR リンドは CDK2 ペプチド特異的 CTL の誘導を抑制する.

第31日本造血細胞移植学会

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療等研究事業）

分担研究報告書

「同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有およびドナーとレシピエントの QOL を視野に入れた成績の向上に関する研究」班

「HLA 不一致臍帯血移植後の抗原特異的免疫回復」

研究分担者 高橋 聡 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 血液腫瘍内科

研究要旨：HLA 不一致の臍帯血グラフトを用いた移植後の抗原特異的、移植後の CMV 抗原特異的な細胞性免疫の回復動態の実際を確認することを目的として、移植後患者における抗原特異的 T リンパ球の回復動態を解析するために、CMV 抗原と共培養を行った患者末梢血内の T リンパ球の反応性について、細胞内の IFN- γ を指標として FCM を用いて解析し、移植後患者における抗原特異的 T リンパ球の回復動態を検討した。その結果、HLA 不一致臍帯血移植後早期の抗原特異的細胞性免疫の回復は骨髄移植および末梢血幹細胞移植とほぼ同等であることが明らかとなった。

A. 研究背景および目的

成人患者に対する臍帯血移植の場合、殆んどは HLA 不一致のグラフトを用いるが、移植後免疫回復に与える影響について、詳細は知られてはいない。

HLA 2 座以上不一致のグラフトを用いる造血幹細胞移植として、現在、実際に臨床応用されている治療法としてはハブロー致ドナーからの移植がある。この場合は、多くは HLA-A, -B, -DR 座のうちの半分の 3 座が不一致のドナー（親、または子供など）から G-CSF で動員された末梢血幹細胞を用いるが、グラフト内の T リンパ球はメモリーが多く、移植時にはグラフトから T 細胞を除去したり ATG を使用するなど非常に強力にグラフトの T 細胞活性は減弱されているが、移植後のリンパ球回復は遅く、移植後しばらく CD8+ T リンパ球が優位であるがナイーブ形質の保持は明らかに不良であるのみならず、TCR レパトアは時にオリゴであり、AICD を起こしやすい。一方、臍帯血グラフト内の T リンパ球は HLA 不一致である以外は大きく異なり、ほぼ完全にナイーブ形質であり、移植時に T 細胞除去や ATG などは通常使用しない。しかし、移植後のリンパ球数の回復は速やかであり、

特に CD4+ T リンパ球の回復は速いことが自験例から明らかになった。また、移植後の CD4+ T リンパ球ではナイーブ形質が比較的保持され、TCR のレパトアや T 細胞機能は正常な成熟 T リンパ球とほぼ同様であった。

本研究では、臍帯血移植患者特有の病態に即した感染症対策の立案の基礎とするために、移植後の CMV 抗原特異的な細胞性免疫の回復動態の実際を確認することを目的とした。

B. 研究方法

臍帯血移植後患者の CMV 再活性化の状況を確認し、さらに通常の抗ウイルス剤による治療経過について、確認した。また、移植後患者における抗原特異的 T リンパ球の回復動態を検討するために、CMV 抗原と共培養を行った患者末梢血内の T リンパ球の反応性について、細胞内の IFN- γ を指標として FCM を用いて解析した。

C. 結果および考察

移植前に CMV 抗体陽性 33 名の中で 31 名では移植後 4 ヶ月以内に CMV 抗原血症の陽性化を認め、抗ウイルス療法を受けた。この 31 名中 30 名

(94%) で CMV 抗原反応性 CD4 陽性細胞が検出された(移植後 1 ヶ月目: 57%; 2 ヶ月目: 81%; 3 ヶ月目: 79%; 4 ヶ月目: 84%)。また、14 名(42%)では CMV 抗原反応性 CD8 陽性細胞が検出された(移植後 1 ヶ月目: 15%; 2 ヶ月目: 19%; 3 ヶ月目: 33%; 4 ヶ月目: 32%)。これらは、CMV メモリー細胞がグラフト中に存在する骨髄・末梢血移植の場合とほぼ同等(CMV 抗原反応性 CD4 陽性細胞は 18/21 (86%) で検出、CMV 抗原反応性 CD8 陽性細胞は 12/21 (57%) で検出)の免疫再構築であった。

今後、より詳細な検討を行うことによって、臍帯血移植患者特有の病態に即した感染症対策を立案するための基盤を整えたい。

D. 結論

HLA 不一致臍帯血移植後早期の抗原特異的細胞

性免疫の回復は骨髄移植および末梢血幹細胞移植とほぼ同等であった。

E. 研究危険情報

特になし

F. 発表

- 1) Takahashi S, Watanabe N, Ooi J, Tomonari A, Konuma T, Tsukada N, Tojo A, Nakauchi H and Asano S. Reconstitution of viral-specific T cell and humoral immunity after cord blood transplantation in adults. Bone Marrow Transplant. 37: S56, 2006.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

分担研究報告書

「同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有およびドナーとレシピエントの QOL を視野に入れた成績の向上に関する研究」

研究分担者	一戸 辰夫	京都大学大学院医学研究科	血液・腫瘍内科学
研究協力者	内山 卓	京都大学大学院医学研究科	血液・腫瘍内科学
	青山 一利	岡山大学病院	血液・腫瘍内科
	豊嶋 崇徳	九州大学病院	遺伝子・細胞療法部
	島崎 千尋	京都府立医科大学大学院	血液・腫瘍内科学
	丸屋 悦子	NPO HLA 研究所	
	佐治 博夫	NPO HLA 研究所	

研究要旨：HLA 不一致血縁者をドナーとする腎移植や造血幹細胞移植の後方視的な解析を通じて、非遺伝母 HLA 抗原 (non-inherited maternal histocompatibility antigens, NIMA) に対する獲得免疫寛容の存在が示唆されており、NIMA に対する寛容を考慮したドナー選択が HLA 不一致造血幹細胞移植の成績向上に寄与し得ることが期待されている。本研究では、マウス骨髄移植モデルを用いて、新生仔期における母同種抗原への曝露過程が、NIMA に対する免疫応答に及ぼす影響に関して検討を行った。胎盤・母乳のいずれか或いはその双方を介して NIMA : H-2^d に曝露されたドナーから骨髄・脾細胞を調製し、移植片対宿主方向に NIMA の不一致が存在するレシピエントに移植を行った後、それぞれの群における移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) の重症度および生存率を比較した。これらのうち、GVHD が最も重症化しにくく最も高い生存率が得られたのは胎盤・母乳の両者への曝露群をドナーとする移植であったが、胎盤或いは母乳のみへの曝露群をドナーとする移植においても、コントロール群と比較して GVHD は軽症にとどまり生存率が改善する傾向が観察された。このような NIMA への寛容効果は、胎盤と母乳の両者を介して NIMA に曝露されたドナーでは出生後 28 週齢においても維持されていた。また、授乳によって獲得される NIMA への寛容効果は、出生後 1 日目・8 日目に単クローン抗体によって CD25 陽性の T 細胞を除去したドナーでは観察されなかった。上記の結果から NIMA への免疫寛容は、臍帯血を介する経胎盤的な NIMA への曝露のみならず、授乳を介する経口的な曝露によっても獲得され、その成立は CD4+CD25+制御性 T 細胞に依存的であることが示唆された。

A. 研究の背景と目的

世界諸地域の中で最も早く「超高齢社会」の到来を迎えたわが国では、今後しばらくの間、骨髄性白血病・悪性リンパ腫など中高年期以降に好発する難治性造血器悪性腫瘍の粗罹患率が経年的に増加していくことが推測されている。これらの疾患の多くは既存の化学療法のみでは長期生存が困難である上に、生活習慣への介入などによる予防可能性も知られていないため、医療資源に持続的

負荷を与えていくことが予測され、分子標的薬などの新規薬剤の導入による治療法の革新が待望されている。一方、長期生存が目指される場合には、現時点においても同種造血幹細胞移植が有力な治療手段であり、実際、1990 年後半以降、プリンアナログを用いた前処置法の普及を通じて、移植適応年齢の上限も 60-70 歳程度にまで拡大されている。

上記のような背景から、臨床現場においては、

化学療法での治療が困難な造血器腫瘍の治療プログラム策定にあたっては、移植のための適切な幹細胞ソースの選択がますます重要な課題となりつつある。成人への臍帯血移植は潜在的な移植需要に対する根本的な解決をもたらす得るものとして期待されているが、他の幹細胞ソースと比較して、生着不全に代表される移植後早期合併症のリスクが十分に克服されていない点に問題が残されている。一方、HLA 複数抗原不一致血縁者からの造血幹細胞移植は、生着不全や重篤な GVHD への危惧から、従来はきわめて限定的にしか実施されてこなかったが、近年、抗体医薬品などを用いた GVHD 予防法の改良を通じて一定の安全性が担保された新たな移植プロトコルの開発が本邦を含む世界各地で進められつつあり、HLA 一致ドナーからの移植に劣らない優れた成績も報告されつつある。

研究分担者は、妊娠中の母児間に見られる双方向性の非自己抗原への接触が、妊娠終了後のそれぞれの免疫系に影響を及ぼし得るという知見を背景に、特に「非遺伝母 HLA 抗原 (non-inherited maternal HLA antigens, NIMA)」に対する獲得免疫寛容機構の存在を前提とする HLA 不一致血縁者間造血幹細胞移植の開発を試みてきた。しかし、これまでに実施された難治性白血病を対象とする前向き臨床試験などの経験から、NIMA 不一致血縁者間移植後の GVHD の重症度には、個体間によって大きな相違があることが判明し、NIMA に対する免疫寛容の成立機構をより詳細に明らかにするとともにその *in vitro* での検出方法を確立することが強く求められるに至っている。そこで、本年度は在胎期間中および出生後の NIMA に対する曝露過程が、以降の NIMA への免疫応答に及ぼす影響を評価することを目的として、マウス骨髄移植モデルを用いた検討を行った。なお、以下の研究はすべて実験実施機関における動物実験倫理規定を遵守して行われた。

B. 研究方法

1) ドナーマウスの作成

既報 (Matsuoka KI, *et al.* Blood 2006; 107:404)

のごとく、オスの C57BL/6 (以下 B6, H-2^{b/b}) とメスの B6D2F1 (H-2^{b/d}) の交配により経胎盤的に臍帯血を介して NIMA: H-2^d に曝露された H-2^{b/b} のドナーを作成し、オスの B6D2F1 とメスの B6 の交配により NIMA に曝露されない H-2^{b/b} のコントロールドナーを作成した。また、母乳による NIMA への曝露の影響を評価するため、経胎盤的な NIMA への曝露歴を有する H-2^{b/b} 新生仔のうち、出生後も B6D2F1 から授乳を受けたドナー ([in utero+oral] 群) に加え、乳母を B6 に変更することにより経胎盤的な経路のみで NIMA に曝露されたドナー ([in utero] 群) を作成した。さらに母乳のみによる NIMA への曝露の影響を検討するため、B6 の新生仔で乳母を B6D2F1 に変更したドナー ([oral] 群) を作成した (図 1)。なお、NIMA 寛容成立時における CD4+CD25+T 細胞の関与を評価するため、[oral] 群の一部に対して出生後 1 日目、8 日目に抗 CD25 単クローン抗体あるいはそのコントロール抗体の投与を行った。授乳の期間は 3 週間とした。

2) 骨髄移植

6-10 週齢のドナーマウスあるいはコントロールマウスから有核細胞 5×10^6 個を含む T 細胞除去骨髄液を調製し、脾から調製した T 細胞あるいは CD4+T 細胞 $0.5-2.0 \times 10^6$ 個とあわせた細胞浮遊液を移植片として用いた。また一部の実験では、28 週齢のマウスをドナーに使用した。

レシビエントには B6D2F1 を使用し、3 時間以上の間隔をあけて全身放射線照射を 2 回行った後、調製済みの上記細胞浮遊液をただちに尾静脈から移植した。

3) GVHD・生存率の評価

移植後の GVHD 重症度は、体重減少、姿勢、活動性、毛並み、皮膚の状態の 5 項目 (各 0-2 点: 最軽症 0 点-最重症 10 点) によるスコアで評価を行い、生存率の算定には Kaplan-Meier 法を用いた。

C. 研究結果

1) NIMA への曝露経路が NIMA への免疫応答に与え

る影響

遺伝的な背景は類似し、NIMA: H-2^d への曝露経路が異なる3群のH-2^{b/b} ドナー ([in utero+oral] 群、[in utero] 群、[oral] 群) から B6D2F1:H-2^{b/d} へのハプロアイデンティカルな骨髄移植を比較すると、[in utero+oral] 群においてGVHDスコアが最も低く、生存率も最も高いという結果が得られた。一方、[in utero] 群、[oral] 群をドナーとする移植においてもNIMAに曝露されていないコントロールH-2^{b/b} ドナーからの移植と比較すると、GVHDスコアは有意に低く生存率もすぐれていた。また、このようなNIMAへの寛容が長期間維持される可能性を検討するため、28週齢の[in utero+oral] 群をドナーとして同様の移植実験を行ったところ、週齢を一致させたコントロールH-2^{b/b} マウス(NIMAへの曝露歴なし)をドナーとする移植時と比較して、GVHDスコアは低く、生存率も有意にすぐれていた。

2) 授乳によるNIMA寛容成立へのCD4+CD25+T細胞の関与の検討

[oral] 群におけるNIMA寛容の成立・維持機構へのCD4+CD25+制御性T細胞の関与を検討するため、移植片の調製時にCD25+T細胞を除去し、CD4+CD25-T細胞を用いて移植を行ったところ、[oral] 群からの移植とコントロール群からの移植の間に生存率の有意差は認められなくなった。次いで、授乳期間中に抗CD25単クローン抗体を投与した[oral] 群をドナーとする移植と、アイソタイプを一致させたコントロール単クローン抗体を投与した[oral] 群をドナーとする移植の比較を行ったところ、同様に生存率の有意差は認められなくなった。

D. 考察

NIMAに対する獲得免疫寛容機構の存在は、頻回の輸血歴を有する腎移植待機患者における非自己HLAに対する抗原特異的な液性免疫応答の低下として1988年Claasらによって初めて記載された。その成立機序には不明な点が多かったが、その後、

国際的なレジストリーを用いた腎移植や造血幹細胞移植の後方視的な解析を通じて、NIMAの不一致が慢性拒絶率の低下やGVHD発症率の低下に関連することが報告されるに至り、近年、その同種移植における役割を解明しようとする機運が生まれている。最近では、複数の研究グループがマウスモデルを用いた検討を試みており、(1) NIMAへの免疫寛容を維持している個体の末梢血では、母由来有核細胞のマイクロキメリズムが検出されやすい；(2) NIMAへの寛容効果はCD4+CD25+T細胞に依存的に維持されている；(3) NIMAへの寛容効果はドナーとレシピエントのMHCの組み合わせによって異なった効果を示す、などの知見が報告されている。

本研究の結果、NIMAに対する免疫寛容の成立には、従来指摘されてきたような臍帯血に含まれる母親由来有核細胞を介するNIMAへの曝露のみならず、出生後の授乳を介する曝露も関与しており、その成立には授乳を受けている期間中に存在する制御性T細胞が関与していることが明らかとなった。乳汁の中には可溶性のMHC分子や免疫調節性のエクソソームが含まれることが明らかにされており、今後、これらがどのような機構により経口的なNIMA寛容の誘導に関与するのかを明らかにしていくことが必要と思われる。また、今後、これらの研究を通じ、NIMAに対する獲得免疫寛容を臨床検体を用いて*in vitro*で評価するシステムが開発されることが望まれる。

E. 結論

NIMAに対する免疫学的低応答性の個体差を説明するひとつの機序として、授乳を介するNIMAへの経口的な曝露歴が関与している可能性が示唆された。

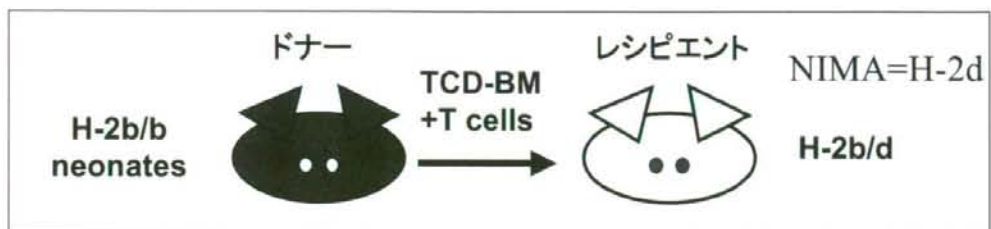
F. 健康危険情報

特記すべき内容はない。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Muramatsu H, Kimura S, Ichinohe T, Ashihara E, Ishikawa T, Maekawa T, Uchiyama T. Consulting clinic for related family donors in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41:1073-1075.
 - 2) Saito T, Yoshioka S, Iinuma Y, Takakura S, Fujihara N, Ichinohe T, Ishikawa T, Uchiyama T, Ichiyama S. Effects on spectrum and susceptibility patterns of isolates causing bloodstream infection by restriction of fluoro-quinolone prophylaxis in a hematology -oncology unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008; 27:219-216.
 - 3) Aoyama K, Koyama M, Matsuoka K, Hashimoto D, Ichinohe T, Harada M, Akashi K, Tanimoto M, Teshima T. Improved outcome of allogeneic bone marrow transplantation due to breast-feeding-induced tolerance to maternal antigens. *Blood* 2009; 113:1829-1833.
 - 4) Kanda J, Ichinohe T, Matsuo K, Benjamin RJ, Klumpp TR, Rozman P, Mehta J, Sohn SK, Uchiyama T. Impact of ABO mismatching on the outcomes of allogeneic related and unrelated blood and marrow stem cell transplantations for hematologic malignancies: Individual patient data-based meta-analysis of cohort studies. *Transfusion* 2009 Jan 2 [EPub]
 - 5) Kanda J, Ichinohe T, Shimazaki C, Hamaguchi M, Watanabe A, Ishida H, Yoshihara T, Morimoto A, Uoshima N, Adachi S, Inukai T, Sawada A, Oka K, Itoh M, Hino M, Maruya E, Saji H, Uchiyama T, Kodera Y. Long-term survival after HLA-haploidentical stem cell transplantation from non-inherited maternal antigen-mismatched family donors: impact of chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2009 Feb 16 [EPub]
- 学会発表
- 1) Shimazu Y, Ishikawa T, Ichinohe T, Kondo T, Yamashita K, Maruyama Y, Uchiyama T. Reactivation of human herpes virus 6 (HHV-6) during hematopoietic stem cell transplantation: risk factor analysis of HHV-6 encephalitis and survival. 50th annual meeting of American Society of Hematology. San Francisco, California, December 8-11, 2008.
 - 2) Kanda J, Mizumoto C, Kawabata H, Ichinohe T, Tsuchida H, Tomosugi N, Matsuo K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T. Clinical significance of serum hepcidin-25 levels on early transplant -related complications after hematopoietic stem cell transplantation. 50th annual meeting of American Society of Hematology. San Francisco, California, December 8-11, 2008.
- H. 知的財産権の出願状況
特になし。



母親	乳母	曝露経路		NIMA寛容
B6D2F1	B6D2F1	[in utero+oral]▶	(++)
B6	B6D2F1	[oral]▶	(+)
B6D2F1	B6	[in utero]▶	(+)

図 1 : 経胎盤的・経口的な曝露経路による NIMA 寛容の誘導

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kim SW, Mori SI, Tanosaki R, Fukuda T, Kami M, Sakamaki H, Yamashita T, Koderu Y, Terakura S, <u>Taniguchi S</u> , Miyakoshi S, Usui N, Yano S, Kawano Y, Nagatoshi Y, Harada M, Morishima Y, Okamoto S, Saito AM, Ohashi Y, Ueda R, Takaue Y.	Busulfex (i.v. BU) and CY regimen before SCT: Japanese-targeted phase II pharmacokinetics combined study.	Bone Marrow Transplant.	Epub ahead of print	Epub ahead of print	2008
Yoshimi A, Kojima S, <u>Taniguchi S</u> , Hara J, Matsui T, Takahashi Y, Azuma H, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kai S, Kato S; Japan Cord Blood Bank Network	Unrelated cord blood transplantation for severe aplastic anemia.	Biol Blood Marrow Transplant.	14(9)	1057-1063	2008
Nagamura-Inoue T, Kai S, Azuma H, Takanashi M, Isoyama K, Kato K, Takahashi S, <u>Taniguchi S</u> , Miyamura K, Aoki K, Hidaka M, Nagamura F, Tojo A, Fang X, Kato S; Japan Cord Blood Bank Network.	Unrelated cord blood transplantation in CML: Japan Cord Blood Bank Network analysis.	Bone Marrow Transplant.	42(4)	241-251	2008
Nishida, T., Murayama, T., Hirai, H., <u>Okamoto S</u> , Sao, H., Hara, M., Kanamori, H., Atsuta, Y., Matsuo, K., Morishima, Y., and Koderu, Y.	Phase II study of tacrolimus and methotrexate for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after HLA-A, B, and DRB1 genotypically mismatched unrelated bone marrow transplantation among Japanese patients.	International Journal of Hematology	89(1)	98-105	2009
Ban, Y., Ogawa, Y., Goto, E., Uchino M., Terauchi, N., Seki, M., Nakaya, M., Saiki, M., Mori, T., <u>Okamoto, S.</u> , Matsumoto, Y., Dogru, M., Shimazaki, J., and Tsubota, K.	Tear function and lipid layer alterations in dry eye patients with chronic graft-vs-host disease.	Eye	23(1)	202-208	2009

Oda, K., Nakaseko, C., Ozawa, S., Nishimura, M., Saito, Y., Yoshida, F., Yamashita, T., Fujita, H., Takasaki, H., Kanamori, H., Maruta, A., Sakamaki, H., <u>Okamoto, S.</u> , Kanto Study Group for Cell Therapy (KSGCT)	Fasciitis and myositis: an analysis of muscle-related complications caused by chronic GVHD after allo-SCT.	Bone Marrow Transplantation	43(2)	159-167	2009
Aisa, Y., Mori, T., Yamamoto, K., Takae, Y., Kato, J., Ikeda, Y., <u>Okamoto, S.</u>	Development of varicella after allogeneic cord blood transplantation in a varicella zoster virus seropositive patient.	Scandinavian Journal of Infectious Diseases	40(8)	684-685	2008
Yamasaki S, Heike Y, Mori S, Fukuda T, Maruyama D, Kato R, Usui E, Koido K, Kim S, Tanosaki R, Tobinai K, <u>Teshima T</u> , Takaue Y	Infectious complications in chronic graft-versus-host disease: a retrospective study of 145 recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with reduced- and conventional-intensity conditioning regimens	Transplant Infect Dis	10(4)	252-259	2008
Kim S-W, Matsuo K, Fukuda T, Hara M, Matsue K, Taniguchi S, Eto T, Tanimoto M, Wake A, Hatanaka K, Nakao S, Ishida Y, Harada M, Utsunomiya A, Imamura M, Kanda Y, Sunami K, Kawano F, Takaue Y, <u>Teshima T</u>	Reduced-intensity unrelated donor Bone Marrow Transplant for hematologic malignancies.	Int J Hematol	88(3)	324-330	2008
Sumida Y, Nakamura K, Kanayama K, Akiho H, <u>Teshima T</u> , Takayanagi R	Preparation of functionally preserved CD4+ CD25high regulatory T cells from leukapheresis products from ulcerative colitis patients, which are applicable to regulatory T cell-transfer therapy.	Cytotherapy	10(7)	698-710	2008

Orita Y, Tsujigiwa H, Nishizaki K, <u>Teshima T</u> , Yoshinobu J, Orita Y, Takeuchi A, Takeda Y, Nagatsuka H, Nagai N	The engraftment of transplanted bone marrow-derived cells into the inner ear.	Eur Arch Otorhinolaryngol	266(1)	59-63	2008
Hamaguchi M, Eto M, Kamiryo Y, Takeuchi A, Hirano M, Tatsugami K, <u>Teshima T</u> , Harada M, Yoshikai Y, Naito S	Allogeneic cell therapy from immunized donors with tumor antigen peptide enhances the antitumor effect after cyclophosphamide-using non-myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation	Cancer Sci	100(1)	138-143	2009
<u>Morio T</u> , Kim H.	Artemis, and Ataxia-Telangiectasia-Mutated: Signaling Networks in DNA Damage.	Int J Biochem Cell Biol.	40	598-603	2008
Shinohara M, Koga T, Okamoto K, Sakaguchi S, Arai K, Yasuda H, Takai T, Kodama T, <u>Morio T</u> , Geha RS, Kitamura D, Kurosaki T, Ellmeier W, Takayanagi H.	Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals.	Cell	132	794-806	2008
Hasegawa D, Fukushima M, Hosokawa Y, Takeda H, Kawasaki K, Mizukami T, Nunoi H, Ochiai H, <u>Morio T</u> , Kosaka Y.	Successful treatment of chronic granulomatous disease with fludarabine-based reduced-intensity conditioning and unrelated bone marrow transplantation.	Int J Hematol.	87	88-90	2008
森尾友宏	Ataxia telangiectasiaの臨床的特徴 全国調査から明らかになったこと	小児臨床	61 (9)	1805-1810	2008

Lu X, Kondo Y, Takamatsu H, Ohata K, Yamazaki H, Takami A, Akatsuka Y, <u>Nakao S.</u>	CD16+ CD56- NK cells in the peripheral blood of cord blood transplant recipients: a unique subset of NK cells possibly associated with graft-versus-leukemia effect.	Eur J Haematol.	81	18-25	2008
Mochizuki K, Sugimori C, Qi Z, Lu X, Takami A, Ishiyama K, Kondo Y, Yamazaki H, Okumura H, <u>Nakao S.</u>	Expansion of donor-derived hematopoietic stem cells with PIGA mutation associated with late graft failure after allogeneic stem cell transplantation.	Blood.	112	2160-2162	2008
Takamatsu H, Espinoza JL, Lu X, Qi Z, Okawa K, <u>Nakao S.</u>	Anti-moesin antibodies in the serum of patients with aplastic anemia stimulate peripheral blood mononuclear cells to secrete TNF-alpha and IFN-gamma.	J Immunol.	182	703-710	2009
<u>Takahashi S.</u> Watanabe N, Ooi J, Tomonari A, Konuma T, Tsukada N, Tojo A, Nakauchi H and Asano S.	Reconstitution of viral-specific T cell and humoral immunity after cord blood transplantation in adults	Bone Marrow Transplant.	37	S56	2006

IV. 研究成果の刊行物・別刷

ORIGINAL ARTICLE

Busulfex (i.v. BU) and CY regimen before SCT: Japanese-targeted phase II pharmacokinetics combined study

S-W Kim¹, S-i Mori¹, R Tanosaki¹, T Fukuda¹, M Kami², H Sakamaki³, T Yamashita³, Y Kodera⁴, S Terakura⁵, S Taniguchi⁶, S Miyakoshi⁷, N Usui⁸, S Yano⁸, Y Kawano⁹, Y Nagatoshi¹⁰, M Harada¹¹, Y Morishima¹², S Okamoto¹³, AM Saito^{14,15}, Y Ohashi¹⁵, R Ueda¹⁶ and Y Takaue¹

¹Hematology and Hematopoietic Stem Cell Transplantation Division, National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan; ²Division of Exploratory Research, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan; ³Department of Hematology, Komagome Hospital, Tokyo, Japan; ⁴Department of Hematology, Japanese Red Cross Nagoya First Hospital, Nagoya, Japan; ⁵Department of Hematology and Oncology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan; ⁶Department of Hematology, Toranomon Hospital, Tokyo, Japan; ⁷Department of Hematology, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital, Tokyo, Japan; ⁸Division of Clinical Oncology and Hematology, Department of Internal Medicine, Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan; ⁹Department of Pediatrics, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, Kagoshima, Japan; ¹⁰Section of Pediatrics, National Kyushu Cancer Center, Fukuoka, Japan; ¹¹National Omuta Hospital, Omuta, Japan; ¹²Department of Hematology and Cell Therapy, Aichi Cancer Center Hospital, Nagoya, Japan; ¹³Division of Hematology, Department of Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan; ¹⁴Department of Hematology and Oncology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan; ¹⁵Department of Biostatistics/Epidemiology and Preventive Health Sciences, School of Health Sciences and Nursing, University of Tokyo, Tokyo, Japan and ¹⁶Department of Internal Medicine and Molecular Science, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan

To evaluate the toxicity and efficacy of an i.v. preparation of BU (12.8 mg/kg), combined with CY (120 mg/kg), a prospective study was performed on 30 Japanese patients (median age, 30 years) with hematologic malignancies undergoing hematopoietic SCT (28 allogeneic transplants from an HLA-matched donor and 2 autologous transplants). There were no significant toxicities, and all but one patient showed evidence of granulocyte engraftment at a median of 14 days for allogeneic and 11 days for autologous transplantation. Grades II-IV acute and chronic GVHD occurred in 9 (9/27, 33%) and 16 patients (16/27, 59%), respectively. Non-relapse mortality at days 100 and 365 was 3 and 17%, respectively. The pharmacokinetics of i.v. BU showed close inter- and inpatient consistency; the area under the plasma concentration-time curve of the first administration remained at less than 1500 $\mu\text{mol min/l}$ in 27 of the 29 patients (93%), and between 900 and 1350 $\mu\text{mol min/l}$ in 22 patients (73%). As all of the profiles overlap with data from non-Japanese patients, we conclude that racial factors may not seriously influence the bioactivity of i.v. BU.

Bone Marrow Transplantation advance online publication, 17 November 2008; doi:10.1038/bmt.2008.372

Keywords: busulfex; BU; hematologic disease

Introduction

In hematopoietic SCT (HSCT), high-dose BU has been widely used, mostly in combination with CY.¹ To overcome the disadvantage of oral BU including gastrointestinal absorption,²⁻¹⁶ i.v. BU was recently introduced into clinical use.¹⁷⁻²⁰ The initial experience with i.v. BU showed satisfactory dose assurance with reliable predictability of pharmacokinetics without dose adjustment.¹⁹ Hence, it is very probable that its use reduces the incidence of various risks at transplantation such as hepatic venoocclusive disease (VOD), as shown by Kashyap *et al.*²¹

Nevertheless, drug profiles of i.v. BU preparation have not been fully evaluated in different races, who may have different pharmacokinetics. As part of our pivotal study in Japan, we conducted a phase II study with pharmacokinetic analysis of a combined i.v. BU and CY (BU/CY) regimen administered before allogeneic or autologous HSCT. A population pharmacokinetic analysis suggested that i.v. BU pharmacokinetics show high inter- and inpatient consistency.²² This study with the same population further focused on complete pharmacokinetic profiles with additional clinical and safety data.

Patients and methods

Eligibility criteria

Patients with acute leukemia, CML, MDS or malignant lymphoma were eligible for this study. Patients aged 5-55 years with a Lansky Performance Status >70 (over 5 and less than 16 years of age) or an Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status ≤ 2 (16-55 years of

Correspondence: Dr Y Takaue, Hematology and Hematopoietic Stem Cell Transplantation Division, National Cancer Center Hospital, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-Ku Tokyo 104-0045, Japan.

E-mail: ytakaue@ncc.go.jp

Received 15 April 2008; revised 29 September 2008; accepted 7 October 2008

age) who were expected to survive beyond 100 days after HSCT were eligible. The eligibility criteria also included serum creatinine less than twice the upper normal limit, as well as serum total bilirubin less than 1.5 times, and aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and gamma-glutamyltranspeptidase less than three times the upper normal limit. Left ventricular ejection fraction $\geq 50\%$ or arterial blood oxygen saturation $\geq 94\%$, and in adult patients a carbon monoxide lung diffusing capacity $\geq 60\%$, were required. Patients with arrhythmia, hypertension or diabetes mellitus that was difficult to control despite medication, severe cardiopulmonary or renal disease, chronic active hepatitis, liver cirrhosis, acute hepatitis, ascites more than 11, central nervous system disorders, active infection; positive hepatitis B surface antigen, hepatitis B core antibody, hepatitis C virus antibody or human immunodeficiency virus antigen/antibody; or prior HSCTs were all excluded. Patients were also required to have either BM available from an HLA-matched related or unrelated donor or G-CSF-mobilized PBSCs available from an HLA-matched related donor without T-cell depletion. The study was conducted in conformity with ICH-GCP and the Declaration of Helsinki. The protocol and informed consent forms were approved by each institution's Research Ethics Committee. All patients gave written informed consent prior to their participation in the study.

Conditioning regimen

The i.v. BU (KRN246; Kirin Pharma Co. Ltd., Tokyo, Japan) was given at 0.8 mg/kg through a central venous catheter for 2 h every 6 h at a total of 16 doses for 4 days on days -7 to -4. CY 60 mg/kg was administered through a central venous catheter for 3 h at a total of two doses for 2 days on days -3 and -2. After a rest on day -1, BM or G-CSF-mobilized PBSC without T-cell depletion was infused on day 0. A fixed-dose regimen for BU was calculated based on either the ideal body weight or actual body weight, whichever was less, for adults (18-55 years of age) and the actual body weight for children (over 5 and less than 18 years of age).

Supportive care

For seizure prophylaxis, phenytoin was administered at 5-10 mg/kg/day (upper limit of 300 mg/kg/day) in 2-3 divided doses starting from 2 days before initiation (day -9) to 48 h after completion of BU administration (day -2). G-CSF was administered on day 1 or 5 until engraftment. For patients undergoing allogeneic HSCT, GVHD prophylaxis consisted of CYA (3 mg/kg/day by continuous i.v. infusion from day -1 in related and 3-5 mg/kg/day in unrelated transplantation) and short-term methotrexate, that is, 10 mg/m² on day 1 and 7 mg/m² on days 3 and 6 in related pairs or 10 mg/m² on day 1 and 7 mg/m² on days 3, 6 and 11 in unrelated pairs. Mesna was administered at a dose equivalent to 120% of CY on days -3 and -2. Other supportive treatments including antiemetic administration, antibiotic treatment, transfusion support, GVHD treatment and VOD treatment were given according to the standards of each hospital.

Evaluation of clinical data

The efficacy variables were myeloablation, engraftment, relapse, overall survival (OS) and disease-free survival (DFS). The safety variables were non-relapse mortality and adverse events included convulsive seizure, VOD, acute GVHD and other organ toxicities. Engraftment was defined as an absolute neutrophil count of $0.5 \times 10^9/l$ for three consecutive days. Engraftment failure was defined as the failure to reach an absolute neutrophil count of $0.5 \times 10^9/l$ by day 28 after transplantation. OS was measured as the time from the day of transplantation until death from any cause, and DFS as the time from the day of transplantation until disease relapse or death from any cause. Relapse, OS and DFS were calculated using the Kaplan-Meier method.²³ non-relapse mortality was defined as any death without progression of the underlying disease. Patients were monitored daily for adverse events, hematology and transplant-related complications. After discharge, patients were followed weekly for adverse events and transplant-related complications, and monitored weekly for hematologic and biochemical data through 100 days after transplantation. The appearance of VOD by day 30 was evaluated based on any two of the major criteria as established by McDonald *et al.*²⁴ and Jones *et al.*²⁵ GVHD was graded according to the consensus criteria.^{26,27} Kirin Pharma Co. Ltd. provided financial support for the medical costs associated with the conditioning regimen, including i.v. BU for enrolled patients, monitored source data and entered these data in a database. Statistical analysis was performed using SAS software (version 8.02; SAS Institute, Cary, NC, USA).

PK sampling and analysis

The objective of this study was to describe the PK characteristics of i.v. BU, with parameters including BU concentrations for the first and ninth administrations and the accumulation of i.v. BU. Plasma samples were collected from all patients at designated times, in conjunction with the first and ninth doses as follows: immediately before drug infusion and at 15, 30 and 45 min after the start of infusion, at 5 min before the end of infusion and at 15, 30, 60, 120, 180 and 240 min after completion of infusion. In addition, one sample was taken immediately before the 13th infusion and 5 min before its completion. The plasma was assayed using a gas chromatographic-mass spectrometric detection method.¹⁰

Plasma concentrations for first and ninth dose in individual subjects were analyzed by the non-compartmental method using WinNonlin (version 3.3; Pharsight Corp., Mountain View, CA, USA). The maximum plasma concentration (C_{max}) and the time to reach maximum plasma drug concentration (t_{max}) were observed values. The terminal half-life ($t_{1/2}$) was calculated as $\ln 2/k_{el}$, where k_{el} was the elimination rate constant, determined by log-linear regression of the terminal phase data points. The area under the plasma concentration-time curve from time 0 to infinity (AUC_{inf}) for the first dose was calculated as $AUC_{0-t} + C_t/k_{el}$, where AUC_{0-t} was the AUC from time 0 to the last detectable time, calculated using linear trapezoidal rule, and C_t was the plasma concentration at

the last detectable time. AUC at steady state (AUC_{ss}) for the ninth dose was calculated by the linear trapezoidal rule. Clearance (CL) was calculated as dose/AUC. Volume of distribution (V_d) was calculated as CL/k_{el} . CL and V_d were normalized to actual individual body weight (CL/ABW and V_d/ABW) on the day of dosing. Summary statistics were obtained for C_{max} , t_{max} , $t_{1/2}$, AUC, CL/ABW and V_d/ABW at the first and ninth dose. The AUC at dose 1 (AUC_{1st}) and dose 9 (AUC_{9th}) and the trough concentration ($C_{p, trough}$) and peak concentration ($C_{p, peak}$) at doses 9 and 13 were calculated and compared by preparing each plot.

Results

Patient characteristics

Thirty Japanese patients were registered in this prospective trial between July 2002 and October 2003. The disease characteristics and status at transplantation are given in Table 1. The median age of the patients was 30 years (range, 7–53 years). The median body mass index (BMI) was 22.65 (14.4–29.1), and the mean BMI was 22.32 ± 3.47 . There were no patients with moderate or severe obesity (BMI < 30). The diseases were AML in 13 patients (43%), ALL or CML in chronic phase in five patients each (17%), non-Hodgkin lymphoma (NHL) in four patients (13%) and MDS in three patients (10%). In total, 11 of the 12 patients with AML were in CR. Four of the five patients with ALL were in CR. Three patients with MDS included refractory anemia, refractory anemia with excess blasts and refractory anemia with excess blasts in transformation. Four patients with NHL included diffuse large B-cell lymphoma in CR ($n=2$), primary refractory peripheral T-cell lymphoma ($n=1$) or suspected extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue in CR ($n=1$). One patient with AML who was in remission at registration was subsequently withdrawn from protocol treatment due to onset of cardiac myopathy on day -3, and CY was changed to fludarabine. Owing to an additional protocol violation, this patient was excluded from the objective group in the analysis.

Engraftment

Twenty-eight patients (97%) achieved engraftment at a median of 14 days (range, 9–20 days) and 11 days after allogeneic and autologous HSCT, respectively (Table 2). One patient who received unrelated BMT for CML had graft failure. No secondary engraftment failure was observed.

Toxicity and complications

All adverse events were those that are commonly observed in HSCT and no characteristic events related to i.v. BU were observed. None of the patients had to interrupt i.v. BU treatment because of adverse events. The number of observed adverse events was 714 in 27 patients who received allogeneic HSCT and 19 in two patients who received autologous HSCT. The most frequent adverse events in the 27 allogeneic HSCT patients were vomiting and nausea in 20 patients each (74%), anorexia in 19

Table 1 Patient characteristics

Variables	n (%)	
	Allogeneic HSCT (n = 28)	Autologous HSCT (n = 2)
<i>Patient age (years) (range, median)</i>	7–53, 30	48–50, 49
5–17	3 (11)	0
18–49	20 (71)	1 (50)
50–55	5 (18)	1 (50)
<i>Gender</i>		
Men	18 (64)	2 (100)
Women	10 (36)	0
<i>Disease</i>		
AML	12 (43)	1 (50)
ALL	5 (18)	0
CML	5 (18)	0
Myelodysplastic syndrome	3 (11)	0
Non-Hodgkin lymphoma	3 (11)	1 (50)
<i>Disease status</i>		
CR, CP, RA	23 (82)	2 (100)
NR, RAEB, RAEB-t	5 (18)	0
<i>Prior chemotherapy</i>	26 (93)	2 (100)
<i>Prior radiotherapy</i>	2 (7)	0
<i>Source of stem cells</i>		
BM	18 (64)	0
Peripheral blood cells	10 (36)	2 (100)
<i>Related or unrelated donor</i>		
Related	19 (68)	NA
Unrelated	9 (32)	NA
<i>Cell dose infused</i>		
Nucleated ($\times 10^6$ /kg, median, range)	2.6 (0.7–4.4)	NA
CD34 positive ($\times 10^6$ /kg, median, range)	2.7 (2.1–6.3)	2.9 (2.7–3.1)

Abbreviations: CP = chronic phase; HSCT = hematopoietic SCT; NA = not applicable; NR = non-remission; RA = refractory anemia; RAEB = refractory anemia with excess of blasts; RAEB-t = refractory anemia with excess of blasts in transformation.

patients (70%), stomatitis and diarrhea in 18 patients each (67%) and headache in 17 patients (63%; Table 2). Both of the autologous HSCT patients showed stomatitis, vomiting, catheter-related infection, anorexia and dysgeusia. No seizures were observed, and with regard to other neuropsychological profiles, seven patients experienced mild dysgeusia, one moderate systemic burning sensation, one severe tremor, one severe mood change and one severe insomnia in an allogeneic setting. With regard to cardiovascular profiles, one patient experienced mild cardiac failure and the other developed moderate cardiomyopathy due to CY in the allogeneic setting, as described above. This patient had completed i.v. BU administration for 4 days and CY once. When the patient complained of chest discomfort, the heart rate was 101 beats/min, and her electrocardiography showed ST depressions in leads II, III, aVF and V_1 – V_6 1 h after the completion of the first dose of CY, which made suspected diagnosis of CY-induced cardiomyopathy. The signs and symptoms subsided shortly, and the second dose of CY on day -2

Table 2 Regimen-related toxicity, engraftment, GVHD and death

Outcome	Allogeneic HSCT (n = 28) (%)	Autologous HSCT (n = 2) (%)
Toxicity		
Vomiting	21 (75)	2 (100)
Nausea	21 (75)	1 (50)
Anorexia	19 (68)	2 (100)
Stomatitis	18 (64)	2 (100)
Diarrhea	18 (64)	0 (0)
Headache	18 (64)	0 (0)
Seizure	0 (0)	0 (0)
VOD	1 (4)	0 (0)
	Allogeneic HSCT (n = 27) (%)	Autologous HSCT (n = 2) (%)
Engraftment		
Median (days)	26 (96)	2 (100)
Range (days)	14	11
	9–20	11
Graft failure		
	1 (4)	0 (0)
Acute GVHD		
Grade I	13 (48)	—
Grade II	4 (15)	—
Grade III	5 (19)	—
Grade IV	2 (7)	—
Chronic GVHD		
	16 (59)	—
Death		
Relapse	8 (30)	0 (0)
Non-relapse	4 (15)	0 (0)
	4 (15)	0 (0)

Abbreviations: HSCT = hematopoietic SCT; VOD = venoocclusive disease.

was substituted by fludarabine with no subsequent complications.

One patient who received allogeneic HSCT was diagnosed with mild VOD on day 1 based on two diagnostic criteria,^{24,25} which resolved on day 3. In another patient, elevated total bilirubin and body weight gain were found on days 60–69, and this was not confirmed to be VOD based on these criteria. Opportunistic infection occurred in 16 of 27 patients (59%), with a median onset of day 113 (range, 7–399). Pulmonary complications occurred in 7 of 27 patients (26%), with a median onset of day 149 (range, 65–335).

GVHD

Acute GVHD occurred in 13 of the 27 patients (48%) who received allogeneic HSCT; four (15%) had grade I, five (19%) grade II and two each (7%) grades III or IV (Table 2). Acute GVHD was documented in 7 of the 19 patients (37%) who received related transplantation (six had grades II–IV), and in six of the eight patients (75%) who received unrelated transplantation (three patients had grades II–IV). Acute GVHD occurred with a median onset of day 45 (range, 7–98). Chronic GVHD occurred in 16 of 27 patients (59%) with a median onset of day 133 (range, 39–239).

Causes of death

Four patients (15%) died of non-relapse causes (Table 2). One patient who received allogeneic HSCT died of multi-

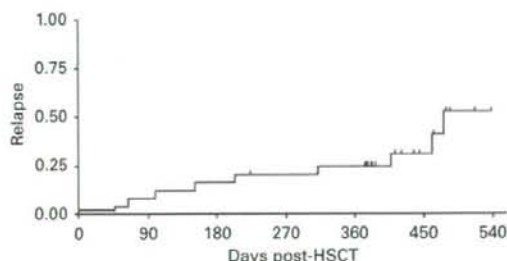


Figure 1 Disease relapse after i.v. BU and CY prior to allogeneic hematopoietic SCT in patients with leukemia and lymphoma.

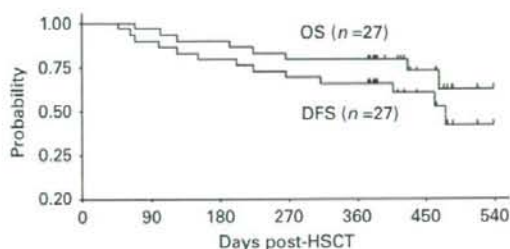


Figure 2 Overall survival and disease-free survival after i.v. BU and CY prior to allogeneic hematopoietic SCT in patients with leukemia, myelodysplastic syndrome and lymphoma.

organ failure due to aggravated GVHD on day 69. Three patients who received allogeneic HSCT died of chronic GVHD on day 223, hepatic failure due to unknown reasons on day 266 (with extensive chronic GVHD and methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA) pneumonia) and pneumonia due to adenovirus and cytomegalovirus on day 124. Four patients (15%) died of relapse.

Relapse and survival

Relapse occurred in 9 of the 23 evaluable allogeneic HSCT patients with leukemia and lymphoma (39%). None of the 23 evaluable patients had central nervous system relapse. The relapse rates at days 100 and 365 were 18% (95% confidence interval (CI), 0–38%) and 26% (95% CI, 8–45%), respectively (Figure 1). The median day of relapse was day 202 (range, 46–476).

OS at days 100 and 365 in allogeneic HSCT was 96% (95% CI, 88–100%) and 78% (95% CI, 62–94%), respectively, with the median follow-up of 413 days (range, 69–537 days) (Figure 2). The median day of death in eight allogeneic HSCT patients was day 208 (range, 69–467). DFS at days 100 and 365 in allogeneic HSCT was 81% (95% CI, 63–99%) and 63% (95% CI, 45–81%), respectively (Figure 2). The two autologous HSCT patients were alive disease-free at day 365.

PK analysis

Intensive PK sampling was assessed at doses 1 and 9 of i.v. BU, and peak and trough levels were obtained at dose 13. Although these analyses were completed in all 30 patients,

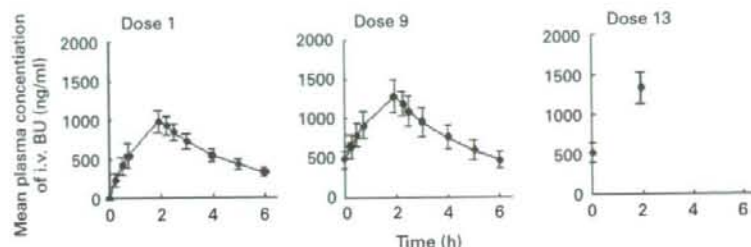


Figure 3 Pharmacokinetic results of i.v. BU at doses 1, 9 and 13 ($n = 30$).

data from one patient were excluded from the objective analysis group as noted above. All PK parameters for dose 1 were obtained from 29 patients. For dose 9, all PK parameters except for C_{max} and t_{max} were obtained from 28 patients because the last sample for one patient was collected after initiation of the next dose (Figure 3). The documented plasma concentration of i.v. BU increased over the 2-h period of infusion, with C_{max} observed in the last 5 min, and this was followed by a rapid decrease. The profile of trough and peak levels was essentially the same between doses 9 and 13.

The resulting parameters are listed in Table 3. The mean AUC for doses 1 and 9 was 1171 $\mu\text{mol min/l}$ (coefficient of variation (CV) = 19%) and 1242 $\mu\text{mol min/l}$ (CV = 17%), and the mean C_{max} was 994 ng/ml (CV = 12%) and 1311 ng/ml (CV = 15%), respectively. The mean CL/ABW was 2.66 ml/min/kg (CV = 17%) and 2.46 ml/min/kg (CV = 15%), respectively. V_d/ABW was 0.601/kg (CV = 9%) and 0.601/kg (CV = 11%), respectively. The AUC of the initial dose was below 1500 $\mu\text{mol min/l}$ in 27 patients (90%), and this was within the range of 900–1350 $\mu\text{mol min/l}$ in 21 of the 29 patients (72%).

The AUC for doses 1 and 9 are compared in Figure 4, which supports both intra- and interpatient predictability and consistency. In the patient who developed VOD, the AUC for doses 1 and 9 was 1102 and 1181 $\mu\text{mol min/l}$, respectively, whereas for the remaining patients without VOD, it was 1173 $\mu\text{mol min/l}$ (CV = 19%) and 1244 $\mu\text{mol min/l}$ (CV = 17%).

Pediatric patients

A 7-year-old girl with AML in first remission received allo-BMT from a matched unrelated donor. Her body weight and BMI were 17.8 kg and 14.4, respectively. Her AUC was 963.9 $\mu\text{mol min/l}$. Her regimen-related toxicities were grade 3 vomiting and grade 2 acute hemorrhagic gastritis and hypoalbuminemia. She is alive without graft failure or relapse.

A 13-year-old boy with CML in first chronic phase received allo-BMT from a matched unrelated donor. His body weight and BMI were 46.7 kg and 18.8, respectively. His AUC was 932.6 $\mu\text{mol min/l}$. His regimen-related toxicities were grade 4 anorexia and grade 2 fatigue and vomiting. He did not achieve engraftment by day 28, and he soon received a second allo-BMT from a mismatched

Table 3 Pharmacokinetics of i.v. BU ($n = 30^a$)

	C_{max} (ng/ml)	$t_{1/2}$ (h)	AUC ($\mu\text{mol min/l}$)	CL/ABW (ml/min/kg)	V_d/ABW (l/kg)
Dose 1					
Mean	999	2.64	1171	2.67	0.596
Median	997	2.66	1144	2.65	0.596
s.d.	124	0.41	216	0.44	0.054
Maximum	1320	3.52	1698	3.72	0.716
Minimum	796	1.97	811	1.94	0.483
Dose 9					
Mean	1317	2.86	1247	2.46	0.601
Median	1315	2.82	1198	2.36	0.605
s.d.	192	0.37	205	0.36	0.068
Maximum	1720	3.59	1686	3.05	0.786
Minimum	964	2.27	889	1.80	0.466

Abbreviations: ABW = actual body weight; AUC = area under the plasma concentration-time curve; CL = clearance; C_{max} = maximum plasma concentration; s.d. = standard deviation; $t_{1/2}$ = terminal half-life; t_{max} = time to observed maximum plasma concentration from dosing; V_d = volume of distribution.

^aFor dose 9, all PK parameters except for C_{max} and t_{max} were obtained from 29 patients because the last sample for one patient was collected after initiation of the next dose.

For dose 1, AUC_{0-6} is shown; for dose 9, AUC_{0-6} for the 6-h dosing interval is presented.

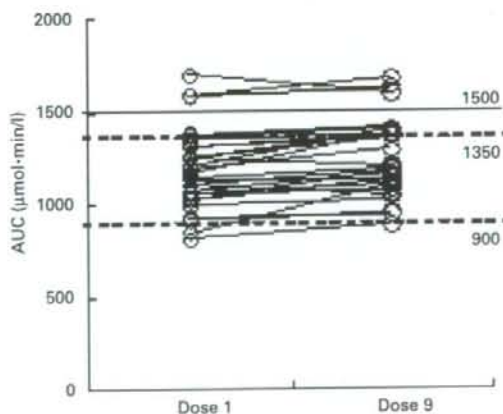


Figure 4 Individual patient area under the plasma concentration-time curve (AUC) values of i.v. BU at doses 1 and 9 ($n = 29$).