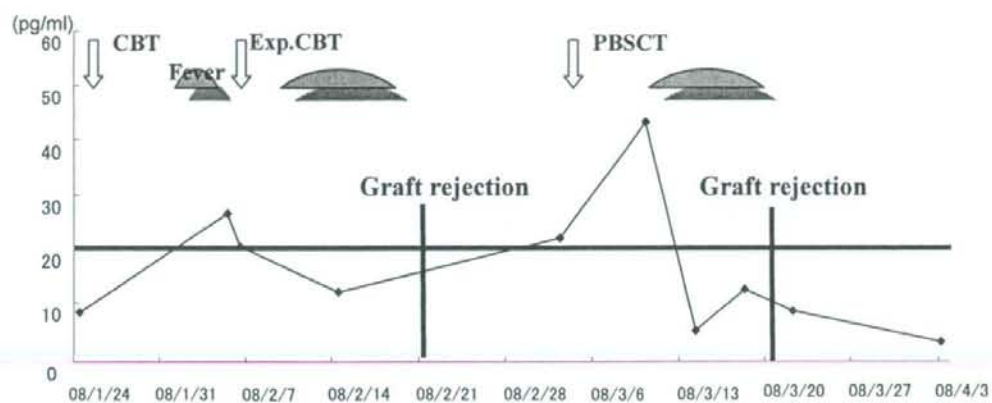
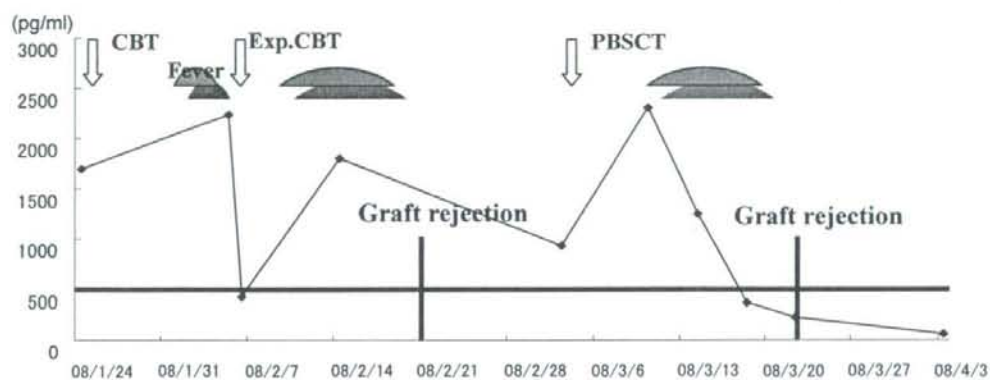


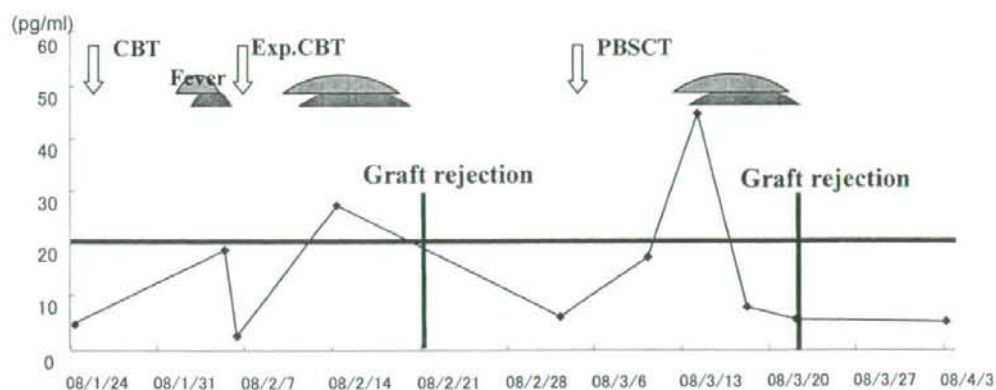
B. IL-8



C. MCP-1



D. IL-6



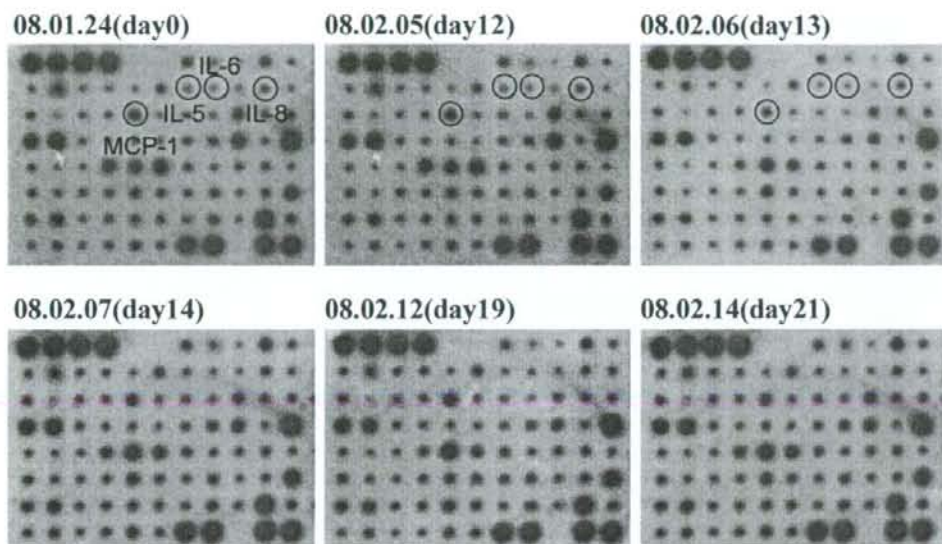
臍帯血移植後 IL-5 に大きな変化は認められなかったが、day9 頃からの敗血症による発熱を認めた時期に IL-8 の軽度上昇を認めた。また MCP-1 は移植前より異常高値を示し、移植後漸増傾向にあったが、IL-6 は正常範囲に留まっていた。

一方増幅臍帯血移植後は、いずれも不変ないしは減少傾向にあり、Fig. 2 の網羅的発現解析に示すように他のサイトカイン、ケモカインにおいても同様の傾向にあった。

その後 day15 頃からの原因不明の発熱時に MCP-1、及び IL-6 の再上昇を認めたが、IL-5、IL-8 は正常範囲に留まっていた。また Fig. 2 に示すようにレシピエント由来の細胞による造血が確認された day19、及び拒絶が確認された day21 において、解析を実施した 85 種類のサイトカイン、ケモカインにおける著明な変化は認められなかった。

同様の変化は、救援目的に実施した末梢血幹細胞移植前後においても認められ、移植後 day10 頃の発熱を認めた時期に IL-8、MCP-1、及び IL-6 の一過性の上昇を認めた。

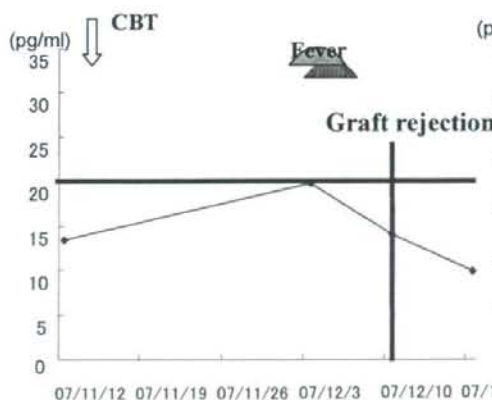
Fig. 2 増幅臍帯血移植前後における網羅的なサイトカイン、ケモカインの発現変化



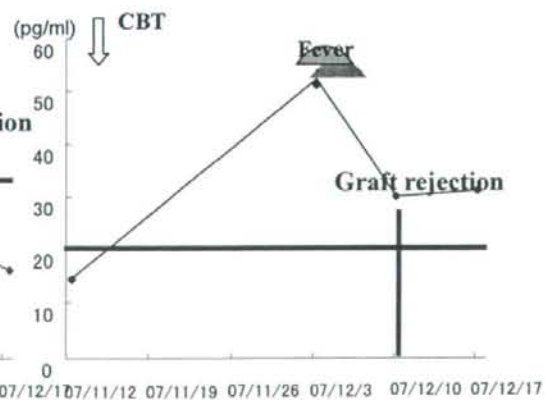
さらに本症例と同様、骨髓非破壊的前処置による臍帯血移植後に生着不全をきたした症例について IL-5, IL-8, MCP-1 の定量を行い、拒絶までの経時的变化を解析した結果、Fig. 3 に示すように時期は異なるものの感染症に伴う発熱を認めた時期に IL-8, MCP-1, 及び IL-6 の上昇を認め、その後速やかな移植片の拒絶が確認されていた。観察期間中 IL-5 には有意な変化は認められなかった。

Fig. 3 生着不全例における IL-5, IL-8, MCP-1, IL-6 の経時的变化

A. IL-5

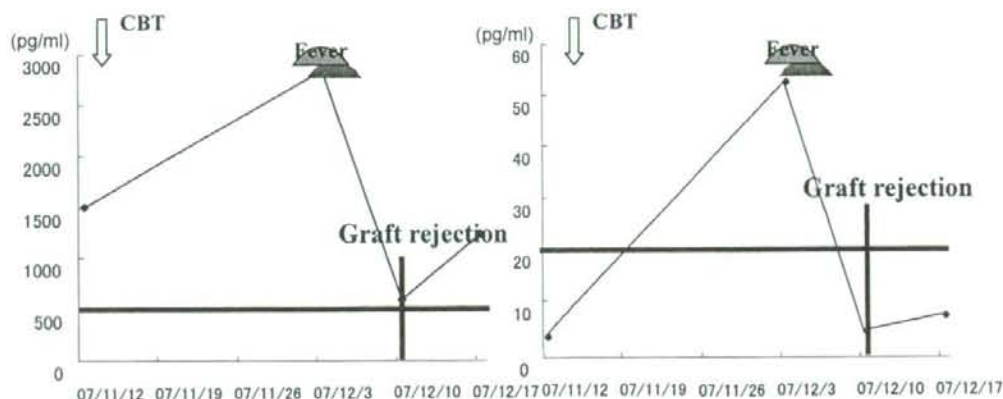


B. IL-8



C. MCP-1

D. IL-6



3) 考察

レシビエント側の移植前後における免疫状態に関し、生着不全に関与するサイトカイン、ケモカインの発現動態については未だ不明な点が多い。これまでに HPS 発症と day10 以降の IL-8, MCP-1 高値との相関、および PIR 発症と day10 以降の IL-5, IL-8 高値との相関が報告されているが、その意義については明らかにされていない。本症例において増幅臍帯血移植後、骨髄における血球貧食を示唆する所見は得られてはいないものの、発熱を認めた時期に IL-8, MCP-1, 及び IL-6 の上昇を認め、その後速やかな移植片の拒絶が確認されており、また本症例における末梢血幹細胞移植後や他の生着不全症例においても移植後早期の感染症による発熱、拒絶に至る経緯においても同様のサイトカイン、ケモカインの動態を認めたことから、移植後早期の感染症がこれらサイトカインを誘導し、PIR における免疫反応を強く惹起している可能性が示唆された。

一方増幅臍帯血移植により炎症性高サイトカイン血症の発症さらには生着反応の阻害(造血幹細胞の自己複製を抑制する、分化を誘導する、アポトーシスを誘導するなど)に関与することが報告されている IFN- γ , TNF- α 等の誘導は認められず、増幅臍帯血が移植前後のサイトカイン、ケモカインの発現動態に及ぼした直接的な影響は少ないと考えられた。

2. 抗 HLA 抗体と臍帯血の HLA に関して

移植前検査にて患者血清から以下の抗 HLA 抗体が検出された。

HLA A23+A66+A68+B8+B13+B35+B39+B4005+B41+B44+B45+B46+B49+B50+B53+B55+B56+B59+B60+B72+B75+B76+B8201

臍帯血 A 1101, 2402 B 4002, 5401, Cw 0102, 0304, DR 0405, 1501

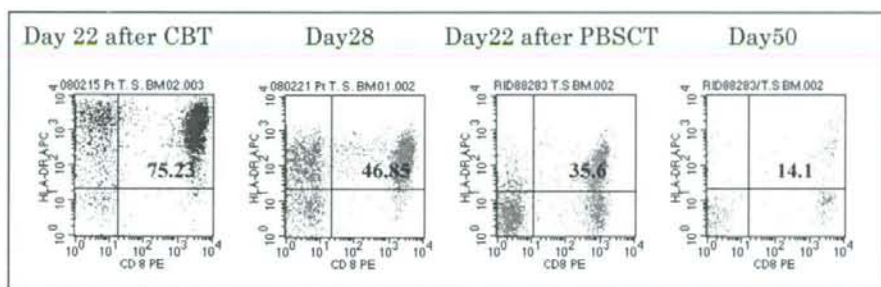
臍帯血と血清のクロスマッチは細胞数が少なく実施不能であった。

しかし、特異的に一致する HLA はない。臍帯血バンクでは抗 HLA 抗体所有の患者において

は、臍帯血移植後有意に拒絶率が高いと報告しているが、特異性がない抗体に関しては、一定の結論は出ていない。また本症例においては、非血縁者骨髄移植における拒絶、GVHD に関する HLA の組み合わせとも異なっており、拒絶の直接の原因とは考えがたい。

3. 拒絶時骨髄に出現したレシピエント由来 T 細胞の解析

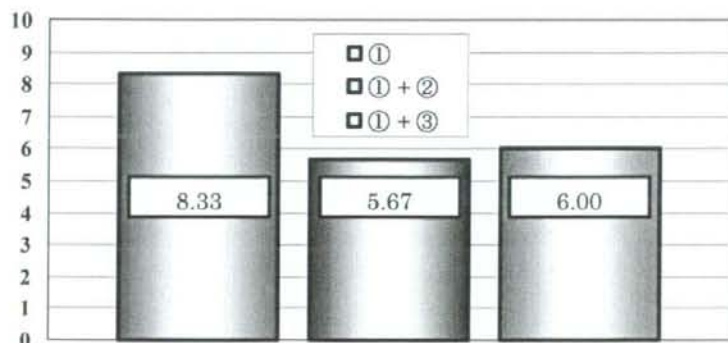
拒絶時 (day 22) の骨髄中 T 細胞の phenotype をフローサイトメトリーにより解析した。



骨髄に浸潤した T 細胞は VNTR 法でレシピエントタイプが確認され、臍帯血移植後拒絶の起きた Day 22 には全骨髄細胞の 75.2% が活性化された CD8 であった。ステロイド治療にも反応せず完全拒絶を確認した Day 28 の骨髄でも活性化されたレシピエントタイプの CD8 細胞が残存していた。また HLA 一座不一致の妹からの PBSCT 後、再び血球減少が起り始めた Day 22 の骨髄では、やはり活性化 CD8 の割合が増加 (35.6%) していた。血球が安定した Day 50 には活性化 CD8 の割合は減少した。(14.1%)

このことより、前処置によって十分レシピエント T 細胞を減少させることが出来なかった上に感染症により、T 細胞が活性化し、アポトーシスを亢進させるような TNF- α などのサイトカインを放出した結果、一度生着しかなかった増殖能があるドナー骨髄細胞が攻撃されて、その結果拒絶に至ったとことが一因として考えられる。

また①拒絶時に骨髄に浸潤していた患者 T 細胞 1000 個に対して②血縁ドナーの血液細胞 lyset ③増幅臍帯血 lyset を添加して INF- γ 産生能をエリスポットアッセイにより、それぞれの移植細胞に対する特異的細胞障害性 T 細胞前駆細胞を求めた。



結果は図に示すとおり、骨髄に浸潤したドナーT細胞は活性化しているものの臍帯血、および血縁ドナー末梢血幹細胞に対して特異的な反応は示さず、(INF- γ 産生はいずれにおいても観察されず、ドナー細胞特異的 CTL precursor は極めて低いと考えられる。) アロ抗原に対する直接的な T cell cytotoxic reaction ではなく、T細胞の活性化による細胞傷害性サイトカインの放出による細胞障害機序が考えられる。

4. 増幅臍帯血のサイトカイン産生能試験

移植に用いた臍帯血サンプルは数に限りがあるために、まったく同様の培養法によって増幅させたヒト臍帯血のサイトカイン産生能をサイトカインアレイおよび Elisa 法によって測定した。方法は当症例に用いた臍帯血サンプルは数に限りがあるため、臍帯血バンクと同様の方法で保存された臍帯血を 12 日間増幅し、製品として得られた増幅細胞を 1×10^6 cells/mL の濃度で QBSF-60 培地、もしくはヒト AB 型血清を最終濃度で 10% となるように添加した QBSF-60 培地中で 37°C 、5% CO_2 濃度の条件でフラスコ培養し、24 時間後の培養上清について、RayBio protein array V (RayBiotech 社) を用いて測定した。陽性反応が認められるサイトカインについては、製品として得られた増幅細胞を 1×10^6 cells/mL の濃度で QBSF-60 培地、もしくはヒト AB 型血清を最終濃度で 10% となるように添加した QBSF-60 培地中で 37°C 、5% CO_2 濃度の条件でフラスコ培養し、24 時間後の培養上清中の IL-8 濃度について、ELISA (Human IL-8/CXCL8 QuantiGlo ELISA Kit : R&D systems 社) による定量を行った。Elisa 法にて定量を行った。Elisa 法にて定量限界以上で測定可能なのは IL-8 のみであったが、産生能は高くないと考えられた。

| サイトカイン類 | QBSF-60培地での培養上清 | | | 10%ヒトAB型血清を含むQBSF-60培地での培養上清 | | |
|---------|-----------------|--------|--------|------------------------------|--------|--------|
| | KCK016 | KCK017 | KCK018 | KCK016 | KCK017 | KCK018 |
| ENA-78 | - | - | - | - | - | - |
| G-CSF | - | - | - | - | - | - |
| GM-CSF | - | - | - | - | - | - |
| GRO | - | ± | - | - | - | - |
| GRO-α | - | - | - | - | - | - |
| I-309 | - | - | - | - | - | - |
| IL-1α | - | ± | + | - | - | - |
| IL-1β | - | ± | + | - | - | - |
| IL-2 | ± | ± | ± | - | - | - |
| IL-3 | - | - | - | - | - | - |
| IL-4 | - | - | - | - | - | - |
| IL-5 | - | - | - | - | - | - |
| IL-6 | - | - | - | - | - | - |
| IL-7 | - | - | - | - | ± | ± |
| IL-8 | + | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| IL-10 | - | - | - | - | - | - |
| IL-12 | - | ± | ± | - | - | - |
| IL-13 | - | - | - | - | - | - |
| IL-15 | - | ± | ± | - | - | - |
| IFN-γ | ± | ± | ± | - | - | - |
| MCP-1 | - | - | - | - | - | - |
| MCP-2 | - | - | - | - | - | - |
| MCP-3 | - | - | - | - | - | - |
| M-CSF | - | - | - | - | - | - |
| MDC | - | - | - | - | - | - |
| MIG | - | - | - | - | - | - |
| MIP-1β | - | - | - | - | ± | + |
| MIP-1δ | - | - | ± | - | - | - |
| RANTES | - | - | ± | - | - | - |
| SCF | ± | ± | ± | - | - | - |
| SDF-1 | + | ± | + | - | - | - |
| TARC | - | - | - | - | - | - |
| TGF-β | - | - | - | - | - | - |
| TNF-α | - | - | - | - | - | - |
| TNF-β | - | - | - | - | - | - |
| EGF | - | - | - | - | - | - |
| IGF-1 | - | - | - | - | - | - |
| Ang | - | - | - | - | - | ± |
| OSM | - | - | ± | - | - | - |
| TPO | - | - | - | - | - | - |

- : negative, ± : very slight, + : slight, ++ : moderate, +++ : severe

| サイトカイン類 | QBSF-60培地での培養上清 | | | 10%ヒトAB型血清を含むQBSF-60培地での培養上清 | | |
|-----------------|-----------------|--------|--------|------------------------------|--------|--------|
| | KCK016 | KCK017 | KCK018 | KCK016 | KCK017 | KCK018 |
| VEGF | - | - | - | - | - | - |
| PDGF-β | - | - | - | - | - | - |
| Leptin | - | - | - | - | - | - |
| BDNF | - | ± | ± | - | - | - |
| BLC | - | - | - | - | - | - |
| Ckβ8-1 | - | - | - | - | - | - |
| Eotaxin | - | - | - | - | - | - |
| Eotaxin-2 | - | - | - | - | - | ± |
| Eotaxin-3 | - | - | - | - | - | - |
| FGF-4 | - | - | + | - | - | - |
| FGF-6 | - | - | ± | - | - | - |
| FGF-7 | - | - | - | - | - | - |
| FGF-9 | - | - | ± | - | - | ± |
| Flt-3 ligand | - | - | - | - | - | - |
| Fractalkine | - | ± | ± | - | - | - |
| GCP-2 | - | - | ± | - | - | - |
| GDNF | - | ± | ± | - | - | - |
| HGF | - | - | - | - | - | - |
| IGFBP-1 | - | - | - | - | - | + |
| IGFBP-2 | - | - | - | - | - | ± |
| IGFBP-3 | - | - | ± | - | - | - |
| IGFBP-4 | - | - | - | - | - | - |
| IL-16 | - | - | ± | - | - | - |
| IP-10 | - | - | - | ± | + | ± |
| LIF | ± | - | - | ± | ± | + |
| LIGHT | - | - | ± | - | ± | ± |
| MCP-4 | - | - | - | - | - | - |
| MIF | ± | ± | ± | - | - | - |
| MIP-3α | - | - | - | - | - | - |
| NAP-2 | ++ | ++ | ++ | ± | - | + |
| NT-3 | - | - | - | - | - | - |
| NT-4 | - | - | - | - | - | - |
| Osteoprotegerin | - | - | ± | - | - | - |
| PARC | - | - | - | - | - | ± |
| PIGF | - | - | - | - | - | - |
| TGF-β2 | - | - | - | - | - | - |
| TGF-β3 | - | - | - | - | - | - |
| TIMP-1 | ± | ± | ± | + | - | - |
| TIMP-2 | + | ± | ± | + | - | - |

-: negative, ±: very slight, +: slight, ++: moderate, +++: severe

単位: ng/mL

| 試験番号 | QBSF-60培地での培養上清 | 10%ヒトAB型血清を含むQBSF-60培地での培養上清 |
|--------|-----------------|------------------------------|
| KCK016 | 0.349 | 2.609 |
| KCK017 | 0.599 | 5.024 |
| KCK018 | 1.058 | 4.351 |
| 平均 | 0.669 | 3.995 |
| SD | 0.360 | 1.246 |

以上の結果から増幅された臍帯血においては、いくつかのサイトカイン、ケモカインを産生する可能性があるが、直接的に血球貪食症候群などの原因になるサイトカインの産生を行う可能性は低く、また産生能も活性化T細胞などと比較して高くないことがわかった。以上のことから本症例において輸注した増幅臍帯血の産生するサイトカインで血球貪食症候群を生じさせた可能性は否定はできないが、産生能、産生サイトカインの種類からレシピエントに残存した活性化T細胞から産生されるサイトカインの関与の方がはるかに可能性としては、高いと考察される。

5) 文献的考察

ex vivo 増幅した臍帯血を用いた臨床試験はまず 1997 年に Shpall¹⁾, Jaroscak²⁾ら 2 つのグループが開始しており、いずれも一つの臍帯血を分割し、一方を増幅せずにそのまま移植、他方をサイトカインにより数日間増幅したのち移植する方法がとられている。Shpall らは進行期の血液、非血液悪性疾患の患者 37 例(成人 25 例、小児 12 例)を対象として、臍帯血を分離せずに GM-CSF、IL-3、FL、EPO 存在下で 12 日間培養し、ATG を含む骨髄破壊的前処置後移植した。一方 Jaroscak らは血液悪性、非悪性疾患の患者 28 例(成人 2 例、小児 26 例)を対象に、臍帯血から CD34 陽性細胞を分離、SCF、G-CSF、TPO 存在下で 10 日間培養し、ATG を含む骨髄破壊的もしくは非破壊的前処置後に移植した。各々における生着不全例は、解析が実施可能であった 30 例中 0 例、24 例中 3 例であり、通常の臍帯血移植と比べてその発生は低率であったことが報告されている。

生着不全 3 例に関しては、

| | 年齢 | 原疾患 | 状態 | 前処置 | 移植 CD34+Llin-細胞数/kg |
|---------|------|-----|----|------|-----------------------|
| Case 1. | 7.75 | ALL | 再発 | 非破壊的 | 4x10 ⁵ /kg |

| | | | | | |
|---------|------|-----|----|------|-------------------------------|
| Case 2. | 2.0 | WAS | - | 非破壊的 | $1 \times 10^4 / \text{kg}$ |
| Case 3. | 3.75 | AML | 再発 | 破壊的 | $1.1 \times 10^5 / \text{kg}$ |

であり、原疾患、状態、前処置、及び移植細胞数との関連は認められなかった。

したがって少なくともこれら2つの臨床試験の結果から明らかになったことは、*ex vivo* 増幅臍帯血は安全に移植可能であり、生着不全率は低率であったが、期待されたような造血回復の促進効果は得られなかったということである。一方最近 Shpallらは臍帯血からCD133陽性細胞を分離し、銅キレート剤であるTEPA (tetraethylenepentamine)とSCF、IL-6、FL、TPOとを組み合わせた方法により21日間培養し、約200倍に増幅した細胞を移植した結果として、生着不全例は7例中0例であり、移植細胞数並びに移植CD34陽性細胞数と好中球、血小板の生着期間との間で相関を認めたことを報告しており³⁾、今後症例数を増やした検討が期待されている。

今後の我々の臨床研究における具体的な対策としては、今回の我々が行った検討からも、前処置後のレシピエント側に残存する免疫能が移植細胞の生着に強く作用する可能性が示唆されたこと、さらには移植後のPIR、engraftment syndromeなどの免疫反応がcyclosporineよりもtacrolimus使用によりその発症が抑制できることが報告されていることから、可能な限り骨髓破壊的な前処置を実施する、ATGを追加する、さらには移植後GVHD予防にtacrolimusを用いるなどの変更を考慮すべきかもしれない。

またスケジュール上、様々な移植後合併症が出現しやすいday12に増幅臍帯血を移植する現行のプロトコルだけではなく、症例によっては複数臍帯血移植において一方を増幅した場合と似た場合の比較試験を実施する必要があると考えられた。

- 1) Shpall EJ, Quinones R, Giller R, *et al.* Transplantation of Ex Vivo Expanded Cord. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2002, 8: 1.
- 2) Jaroscek J, Goltry K, Smith A, *et al.* Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase I trial using the Aastrom Replicell System. *Blood*. 2003, 101(12): 5061.
- 3) de Lima M, McMannis J, Gee A, *et al.* Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone Marrow Transplant*. 2008, 41(9):771

まとめ

Ex vivo 増幅臍帯血移植の1例目の症例を報告した。この症例においては、増幅臍帯血移植後、一度生着しかかった臍帯血由来細胞が発熱、CRP、LDHの上昇とともに拒絶されたため、試験を中止し、救命のために、HLA一座不一致の妹(2005年に行ったBMT 1st donor)より末梢血幹細胞移植を行った。

拒絶の原因として増幅臍帯血輸注の関与が疑われ、この臨床試験自体を休止した。臨床経過の詳細な解析、サイトカイン定量、ドナーT細胞の細胞障害性試験などを行った結果、増幅臍帯血移植に伴って生じた現象ではなく、救命のために行われた末梢血幹細胞移植においても全く同様の血球減少の現象が認められた点、血流感染症に続発して、サイトカインの上昇が認められてその結果、血球貪食症候群を疑わせる高LDH血症、高フェリチン血症などPIR(pre-engraftment immune reaction)の発症が病態の本質と考えられた。したがってex vivo 増幅臍帯血移植によって生じた拒絶とは考えにくく、むしろ増幅臍帯血移植によって拒絶前の骨髓検査において、明らかに赤芽球の生着促進効果が確認されたメリットは特筆すべき事項と考えられる。

逆に言えば臍帯血移植の拒絶のうち、移植細胞数不足以外のPIRに続発する拒絶に関しては、Ex vivo 増幅臍帯血移植においても生着に有利に働くことはできなかったことであり、ドナーT細胞が残存しないような前処置の強化や、免疫抑制剤の投与法の検討、あるいは早期からのステロイド使用などが必要であると考えられた。