

—20 CD34+/ml 以下。

CD34 陽性細胞の測定法は標準化されていない。細胞数が多い・少ないという判断は移植医と NMDP のメディカルディレクターが話し合い、その後どうするかを決めている。

2. 例えば、CD34 陽性細胞が 0.3×10^6 だった場合、このプロダクトをどう扱うか。

—CD34 陽性細胞が少ないケースは稀であるが、起きた場合には NMDP のメディカルディレクターが患者の疾患や体重等を考慮してケースごとに検討する。Day6 の採取を行う、移植して生着するかどうかを確認する、緊急で同一ドナーからの骨髄移植へ移行する(=これは極めて稀とのこと)、追加の PBSC 採取(別の日に行い、採取量を増やす。=これも稀ということであった)を行うこともある。

3. 細胞数が少なくて移植しなかったケースはあるか。

—移植施設が使用しないことはほとんどないが、このようなケースでは、同ドナーからの BM のセカンドドネーションをリクエストすると思われる。この場合、ドナーセンターとドナーへ即座に知らせるが、承認されてもセカンドドネーションは何週間か経過し、生着がないことが確認されてからでないと思われたいと思われる。生着しなかった場合、ドナーと採取施設の都合がつき次第すぐに採取を行う(PBSC でも骨髄でも)。最終同意の説明の際にセカンドドネーションの可能性を説明しておき、実際にその必要が出てきたら同意を確認する。

4. その場合の代替手段としての移植ソースはなにか。

①臍帯血 ②血縁 BM・PBSC ③非血縁 BM(同一ドナー/別ドナー)

—同ドナーからの BM 提供が多いと思われる。移植医と NMDP のメディカルディレクターが検討して決める。その他の選択肢は、最初の検索時にそれらの選択肢がどのように考えられていたかによる。

5. NMDP に CD34 陽性細胞数と生着および移植成績の関係のデータはあるか。

—Donor, recipient, and transplant characteristics as risk factors after unrelated donor PBSC transplantation: beneficial effects of higher CD34+ cell dose (Michael A. Pulsipher)

○概要

1999 年～2003 年の NMDP による UR-PBSCT の成績に関する前向き試験に登録した 932 名の患者 (AML, ALM, CML, MDS) の結果によると、異なるいくつかの強度のレジメンで移植を行った患者でも同様の生存率であった。移植した CD34 陽性細胞数が多いと生着が早く、TRM は低く、3 年生存率も高かったが、GVHD のリスクを高めることはなかった。

<費用について>

1. PBSCH の方が BMH よりも費用が安い理由は何か。
2. ワークアップキャンセル料、術前健診キャンセル料、採取キャンセル料が PBSC と BM で異なるのはなぜか。

—BM と PBSC の採取工程、関わるスタッフや設備は全く異なるからである。また PBSC は FDA の

Investigative New Drug のカテゴリーに含まれているため、手続きの中で追加のステップが必要になることも理由の一つである。

<その他>

1. PBSC の細胞濃度、添加する抗凝固剤や自己血漿の割合、オーバーナイトで保存する時と運搬時の温度についてのガイドライン

ーオーバーナイトで保存するときも、運搬時も 2~8℃とする。

採取した PBSC の総量は、最低 200ml。血球分離器によっては自己血漿を採取し、採取した PBSC へ添加する必要があるものがある。単核細胞採取での一般的なクエン酸:全血の割合は 1:12~1:13 である。この割合においては、ACD-A:最終的なプロダクト中の血漿の割合は 1:6~1:8 がよい。

細胞濃度についての記載はない。

○PBSC プロトコールより原文引用

11.4.1. Leukapheresis schedule

One or two mononuclear cell-leukapheresis collections will be required and determined according to the unadjusted body weight of the recipient (Table 3). PBSC will be collected using the Fenwal CS-3000, COBE Spectra or comparable automated cell separator according to established procedures. The apheresis facility must have a written procedure(s) for the collection of peripheral blood stem cells by leukapheresis.

It is expected that routine leukapheresis procedures under this protocol will only occur on Monday through Friday. The available schedules for leukapheresis are displayed in Table 4 for all recipient weights.

Each PBSC product, each day of collection, should have a minimum final volume of 200 mL after removal of a maximum of 5 mL for testing. For some blood cell separators, additional autologous plasma will need to be collected and added to the PBSC product at the end of the procedure. Mononuclear cell apheresis collections are generally performed using citrate:whole blood ratios of 1:12 to 1:13. Using these ratios, the ACD-A:plasma ratio in the final product should be 1:6 to 1:8.

The use of heparin to reduce ACD-A requirements during leukapheresis is allowed, but at low ratios there is an increased rate of clotting in the product. Therefore, if a citrate:whole blood ratio of less than 1:13 is used, then 15 mL of ACD-A should be added to the component bag immediately after the procedure is completed to prevent the product from clotting.

2. アフェレーシスセンターに対するインセンティブ

ーアフェレーシスセンターは PBSC 採取に対して支払いを受ける。また、G-CSF 投与を行うアフェレーシスセンター、ドナーセンター、ホームヘルスエージェンシーに対する支払いもある。

3. 運搬者のトレーニング

—幹細胞の運搬に関する主な違いは、PBSCは2～8℃で運搬するのに対して、ほとんどのBMは室温で運搬することである。そのため包装や冷却パックが主な違いとなる。NMDPのネットワークウェブサイトには運搬者トレーニングのセクションがある。

○追加情報

NMDPでは、ボランティア(早期退職した人等)が規定のトレーニングを受け資格を得て運搬者として活動しているという情報があった。定かではないが400人程いるのではないかとのことであった。(WMDA会議のラウンドテーブルディスカッションにて)

<追加>

1. NMDPでBMTからPBSCへ広げた時の方法、施設を限ったのか、施設の基準、査察、採取施設の決定の仕方、ドナーへの周知など。

—1994年にBMドナーのセカンドドネーションから始めた。当時はアフレーシスの基準がなかったが、血縁者間でのPBSC採取を行っていた移植施設やT-cell採取を実施していたアフレーシスセンターに(半強制的に)協力してもらった。そうして準備を進め、1999年から1回目提供からのPBSC採取を開始した。当初は施設の経験に頼って開始し、15年かかって現在のような明確な基準ができた。

2. ドナーのフォローアップについて

—プロトコルに則ってドナーセンターの責任下で行っている。ドナーセンターがドナーに健康状態を伺い(電話・メール等にて)、NMDPの指定するフォームを提出する。具体的な方法はBMもPBSCも同様で、以下のとおりである。

○採取2日後、1週間後(その後はドナーが回復するまで週1回) : ドナーの健康状態をチェックするアンケートを行う。

○1ヵ月後、6ヵ月後 : データ収集のために健康状態を伺い、NMDPが指定するフォームを提出する。

○その後1年に1回、ドナーが必要とする限り一生 : NMDPの長期フォローアップの一環としてドナーの健康状態を伺う。

※血液検査を特定の時期に実施することを決めてはいないが、ドナーが参加している研究があればそのプロトコルに従って実施する。

3. NMDPにおける今後の幹細胞ソースの見通し

—過去の傾向に基づいて予想すれば、PBSCが50～60%、臍帯血が30%、BMが20%というような割合になるだろうと考えている。しかし、BMT-CTN0201(PBSC vs BM)の研究など、様々な研究の結果が幹細胞のリクエストに大きな影響を与えるので予想は難しい。

以上

2010.1.31

厚生労働科学研究
免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「同種末梢血幹細胞移植を
非血縁間で行う場合等の医学、医療、社会的基盤に関する研究班」

非血縁PBSCTのドナーコーディネート について

大阪市立大学 医学研究科 血液腫瘍制御学
(血液内科・造血細胞移植科)
日野雅之

論点

ドナー意思決定

患者側の希望をドナーに伝えるか？

ドナーの提供意思決定

(1) 登録時

・医師の面談がなく、十分な説明を受けていないため、
BMHかPBSCHどちらかを選んだとしても、意思が変わる
可能性があるため、希望は聞かない。
・2つの方法の情報提供のみとする(DVDなど)。

ドナーの提供意思決定(当初の案)

(2) 確認検査時

・医師の面談があり、十分な理解が得られる可能性が高
いことから、確認検査時には2つの方法を説明する。

ドナー選定に影響するため、ドナーの希望を移植主治医
に報告する。

どちらでもよい。

BMのみ希望

PBSCHのみ希望

患者の希望を聞いて決めたいドナーは、どちらでもよいを
選ぶ⇒確認検査では患者の希望を伝えない

ドナー希望を聞く前に、患者希望を伝えるべきではない
か？

(伝える事を支持する意見)

・患者にとって最も良い方法を仲介する事がバンクの使
命であるため、患者の希望は伝えるべきである。

(NMDPでは、最終同意時に伝えている)

・ドナーが患者希望を知っていた場合に選択が変わって
いた可能性があり、財団がそれを知りながら、ドナーに伝
えない事は問題ではないか。

・ドナーが希望した場合に、情報を伝えないことは問題で
はないか

ドナー希望を聞く前に、患者希望を伝えるべきではない
か？

(伝えない事を支持する意見)

・患者希望を伝える事で、ドナーの自由意志による決定を
無理に誘導しないか

・患者の病状によっては、当初の希望と変わる場合もある
ため、かえって混乱が生じないか

・多くのドナーは「どちらでもよい」を選んでくれると思われ
るので、結局、患者の希望通りになる可能性が高い

患者希望の伝え方の提案

(1)ドナーが希望した場合のみ、伝える

(2)患者希望も変わる可能性があるので、両方の可能性を示唆する

(例)

「患者は、現在BMTを希望しています。しかし、病状によってはPBSCTの方が良い場合があり、希望が変更されるかもしれません。以上の点も考慮していただき、ご希望をお知らせください」

一方を断定しているわけではなく、多くの場合は、「どちらでもよい」を選んでもらえることを期待する。

ドナーの提供意思決定

現在の骨髄のコーディネートでも、確認検査の時点で、骨髄採取に不同意の場合は、終了となることから、希望ではなく、承諾(不同意)という表現にしてはどうか。

(2) 確認検査時

・医師の面談があり、十分な理解が得られる可能性が高いことから、確認検査時には2つの方法を説明する。

ドナー選定に影響するため、ドナーの希望を移植主治医に報告する。

どちらでもよい。

BMのみ承諾(PBSCHは不同意)。

PBSCHのみ承諾(BMは不同意)。

確認検査時の双方の希望の組み合わせ

患者	ドナー	採取
どちらでもよい	どちらでもよい	BM/PBSCH
どちらでもよい	BMのみ承諾	BM
どちらでもよい	PBSCHのみ承諾	PBSCH
BM希望	どちらでもよい	BM
BM希望	BMのみ承諾	BM
BM希望	PBSCHのみ承諾	終了
PBSCH希望	どちらでもよい	PBSCH
PBSCH希望	BMのみ承諾	終了
PBSCH希望	PBSCHのみ承諾	PBSCH

終了以外は、患者希望に一致

患者がどちらでもよい場合: 移植できる事を優先し、あえて希望を出せない可能性もある

ドナーの提供意思決定

(3) 最終同意時

最終同意後の変更は原則として認めない。

最終同意は、選択して頂いたどちらか一方についての同意をいただくこととする。

(どちらでも良い場合は、患者の希望する側)

・最終同意で、ドナーおよび家族の希望と患者希望が異なった場合は、コーディネート終了

最終同意時にドナー希望が変わった場合

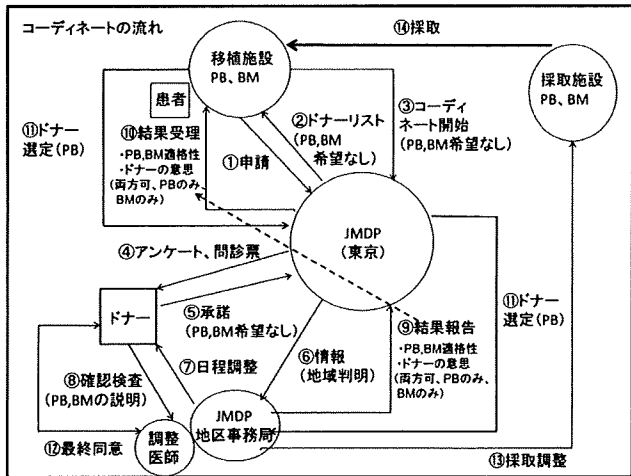
患者	ドナー希望変更	採取
どちらでもよい	どちらでもよい	BM/PBSCH
どちらでもよい	BM->PBSCHのみ承諾	PBSCH
どちらでもよい	PBSCH->BMのみ承諾	BM
BM希望	どちらでもよい->PBSCHのみ承諾	終了
BM希望	BM希望->PBSCHのみ承諾	終了
PBSCH希望	どちらでもよい->BMのみ承諾	終了
PBSCH希望	PBSCH希望->BMのみ承諾	終了

術前健診での終了

・BMHとPBSCHで適格基準(高脂血症など)が異なるため、術前健診(高脂血症検査を術前に入れた場合)の結果で、PBSCH不適格になる場合がある。

例えば、PBSCTのみを希望している患者の場合は、術前健診に高脂血症を入れると、この時点で終了となってしまう。

患者およびドナーともに「どちらでもよい」場合は、最終同意からコーディネートを再開する?



論点のまとめ

患者側の希望をドナーに伝えるか？

- (1) 伝えない
確認検査時のドナーの意思を希望ではなく、承諾（または不同意）とする
- (2) 伝える
 - (a) 希望したドナーには伝える
 - (b) 全ドナーに伝える
 - (c) 両方の可能性を示唆し、全ドナーに伝える

平成21年度厚生労働省免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業
「同種末梢血幹細胞移植を非血縁者間で行う場合等の医学、医療、社会的基盤に
関する研究」班（宮村班）平成22年1月31日（日）

非血縁末梢血幹細胞採取・移植施設基準の検討

北海道大学大学院医学研究科血液内科学
田中淳司

将来予測(1)

非血縁末梢血幹細胞移植が血縁並みに行われたら

2002年	777/1094	71%
2006年	474/915	52%
2007年	453/910	50%

年間約500例？

将来予測(2)

非血縁末梢血幹細胞移植が保険適応

原則として全てのドナーさんと
患者さんの意志を尊重すべき

原則として全てのJMDF認定移植施設
で採取を行わなければならない？

施設認定の問題点(1)

ドナーさんの意志を尊重
少しでも多くの認定施設が全国に必要

ドナーさんの安全を最優先に
厳格な認定基準が必要

施設認定の問題点(2)

非血縁末梢血幹細胞採取が可能か	52%
CD34測定(当日判定)	75%
日本輸血細胞治療学会認定施設	66%
凍結/院内における血液細胞処理のための指針	68%

施設認定

DLI認定51施設中

体制が整えば採取可能	10施設
CD34測定可能ではない	9施設
輸血・細胞治療学会認定施設ではない	10施設

非血縁者間末梢血幹細胞採取施設認定基準（原案）

1. JMDPの非血縁者間骨髄採取施設認定基準とDLI採取施設基準を満たすこと。
2. （改訂）同種末梢血幹細胞移植のための健康人ドナーからの末梢血幹細胞動員・採取に関するガイドラインの実施施設の適格性を満たすこと。
3. 迅速にCD34陽性細胞数が測定できる体制が確立されていること。
4. 施設において下記の（1）または（2）のいずれかを満たすこと。
 - （1）過去2年以内に末梢血幹細胞採取術を5例以上実施していること（うち3例以上は健康人から）
 - （2）過去1年以内に末梢血幹細胞採取術を3例以上実施していること（うち2例以上は健康人から）かつ、過去に末梢血幹細胞採取術を10例以上経験している医師が採取責任医師となること。

非血縁者間末梢血幹細胞採取施設認定基準（改訂案）

1. JMDPの非血縁者間骨髄採取施設認定基準とDLI採取施設基準を満たすこと。
2. （改訂）同種末梢血幹細胞移植のための健康人ドナーからの末梢血幹細胞動員・採取に関するガイドラインの実施施設の適格性を満たすこと。
3. 迅速にCD34陽性細胞数が測定できる体制が確立されていること。
4. 施設において下記の(1)(3)または(2)(3)のいずれかを満たすこと。
 - （1）過去2年以内に末梢血幹細胞採取術を5例以上（うち3例以上健康人から）実施していること。
 - （2）過去1年以内に末梢血幹細胞採取術を3例以上（うち2例以上健康人から）実施していること。
 - （3）過去に末梢血幹細胞採取術を10例以上経験している医師が採取責任医師となること。また施設として少なくともアフターケアを30回以上実行した経験を有すること。

非血縁者間末梢血幹細胞移植施設認定基準（案）

1. JMDPの非血縁者間骨髄移植施設認定基準を満たすこと。
2. 非血縁者間末梢血幹細胞採取施設基準を満たすこと。
3. 末梢血幹細胞凍結を行う場合には「院内における血液細胞処理のための指針」を順守すること。

予想される認定施設数

DLI施設中

2 3 施設（体制が整えば+ 9 施設）

非DLI施設

2 4 施設（体制が整えば+ 1 2 施設）

合計

4 7 施設（体制が整えば+ 2 1 施設）

予想される認定施設数

導入時

DLI認定施設 2 3 施設

1 年目

非DLI認定施設 2 4 施設/合計 4 7 施設

2 年目

体制が整えば可能な 2 1 施設/合計 6 8

3 年目以降

申請された順に認定 約 2 0 施設/年

今後の予定

非血縁末梢血幹細胞採取・移植施設基準の確定

開始に向けて施設の決定/調整

施設査察体制の確立と実施

皆様のご協力をよろしくお願い致します

厚生労働省免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業
「同種末梢血幹細胞移植を非血縁者間で行う場合等の医学、
医療、社会的基盤に関する研究」班 研究代表者 宮村耕一

非血縁者末梢血幹細胞採取の最適化 に関する研究

久留米大学 血液・腫瘍内科
長藤宏司

課題

非血縁ドナーに対する
(外来を原則とした)、
安全な同種末梢血幹細胞採取を確立する

課題への対応

当初、最少入院期間、画一的な
採取スケジュールを考えたが、

ドナーと採取病院の地理的關係、採取施設
の状況などを考慮する必要がある

個々の採取施設の現状を尊重する方向へ

外来PBSC採取の検討

—九大病院・虎の門病院—

曜日	月	火	水	木	金	土
外来	○	○	○			
入院				○	○	(○)
採血	○	○	○	○	○	(○)
G-CSF注射	○	○	○	○	(○)	
末梢血幹細胞採取				○	(○)	

疑問

- ・ 最も効率的に同種PBを採取できるのは、
- ・ Day4開始か
- ・ Day5開始か

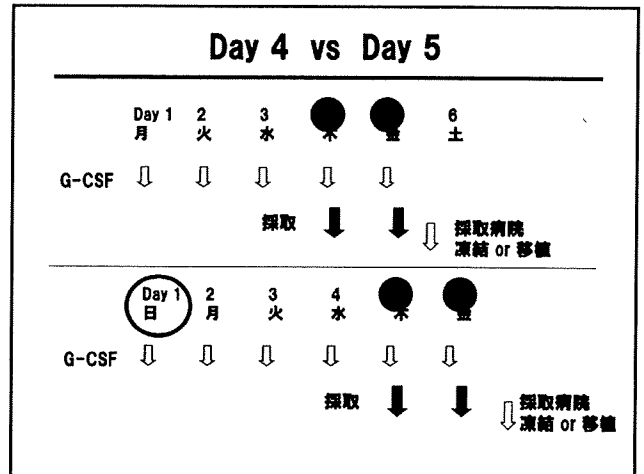
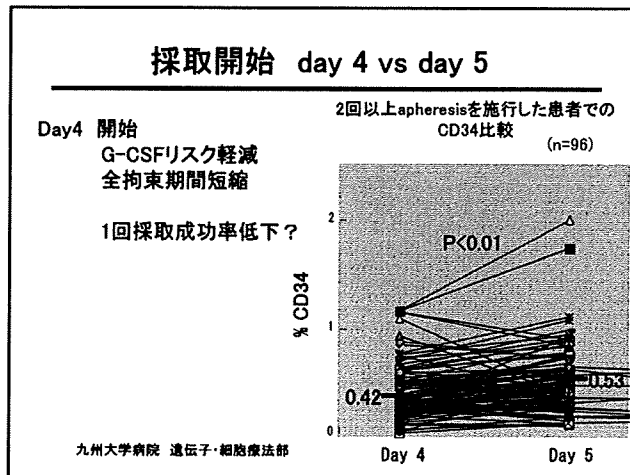
対象：1999年10月より2008年7月まで九州大学病院・輸血センターにて
施行した血縁者間同種末梢血幹細胞採取244例のなかで、
日本骨髄移植推進財団の骨髄バンクドナー年齢条件である18歳以上、
55歳以下に該当する症例を対象とする

ドナー症例 199例
年齢 中央値 38歳(18-55)
男：女 93：106
体重 59.6 kg(36.8-87.9)

Recipient
年齢 中央値 38歳(0.4-70)
体重 53.7 kg(4.7-102)

G-CSF 10 μ g/kgまたは400 μ g/m²を連日1回皮下注。
Day4から採取を開始。
採取したCD34陽性細胞数が充分量に達するまでday5.6と随時採取を行う

((アフェレーシスはCOBE Spectralにて実施
採取量は、アフェレーシス脱血速度(血管の太さとかVVRとか)
ドナーの全身状態に依存することが多かった)))



Blood access

カテーテル挿入: ドナーのリスクの観点から望ましくない

カテーテル必要: 健康人ドナー: 15/155 (約10%)

九州大学病院 遺伝子・細胞療法部

カテーテル認めないと、10%の採取不可のリスク

Blood access

カテーテル挿入を認めない場合:

ドナーの意思決定の前、コーディネーター中に血管(正中静脈)の評価が必要

採取病院の検診でとれそうにないと判断されたらどうする?

G-CSFを打った後で入院後、十分なフローがとれないとどうする?
採取医が穿刺失敗したらどうする?

Blood access

中心静脈カテーテル挿入について

既存のガイドラインなど

名古屋大学医学部附属病院 中心静脈カテーテル挿入マニュアル
<http://www.mms-net.com/~med.nagoya-u/anesth/cv/CVmanual2.pdf>

日本麻酔科学会
安全な中心静脈カテーテル挿入・管理のための手引き2009
http://www.anesth.or.jp/dbps_data/_material/_localhost/a.pdf

Blood access

中心静脈カテーテル挿入について

中心静脈へのアクセスについて

- PBドナーの適格性に、採取に適する末梢静脈がある を創る 確認検査時に、適格性を判断
- 末梢静脈から採取できると判断されていたが 実際に採取したら、血流量が確保できない 血管穿刺がうまくゆかず、末梢静脈が確保できない
- 上記の場合は、大腿静脈にアクセスする

中心静脈へアクセスする可能性があることを あらかじめドナーにインフォーム

考察1

- 採取を外来主体で行うか、入院主体で行うかは、採取施設、ドナー、ドナーと採取施設の地理的關係等により異なる
- 採取開始日は、day4 day5 いずれも許容される

考察

- 中心静脈へのアクセスについて
 1. 明らかに末梢からの採取が無理ドナー適格性について
 2. 末梢から採取したが無理で、移行血管が取れないので、G-CSFを投与した後に中止は実際的でない
- 中心静脈へアクセスする可能性があることをあらかじめドナーにインフォーム
- 中心静脈にアクセスした場合、後出血に対する対応
 1. 退院のスケジュール
 2. 穿刺部の処置

UR-PBSCTの将来

しけん しけん UR-PBSCTの臨床試験に 関する私見 しけん

UR-PBSCTにおける臨床試験について

1. GVHD予防法を筆頭に、移植前処置法など適切な移植方法がわからない状態で、これらの移植方法を統一した多施設共同臨床試験の実施は難しい。
2. 経験の豊富なUR-BMTと経験の少ないUR-PBSCTを適切に比較するためには、UR-PBSCTについてもある程度の臨床経験と移植方法の至適化が必要である。

UR-PBSCTにおける臨床試験について

1. したがってUR-PBSCTの多施設共同臨床試験を行うのであれば、単群でGVHD予防法などの至適化を目指した臨床試験を計画すべきである。
2. しかし、様々な因子を調整しなければならない現状で、画一的な用量設定試験の実施は困難であり、おそらくLearning curveによる移植成績の改善を妨げる。
3. かといって、各施設の最良にゆだねた診療のretrospective studyには限界がある。(必要な情報を収集できない。)

UR-PBSCTにおける臨床試験について

1. そこで、移植前に前処置、GVHD予防法などの移植方法について、いくつかの選択肢を設定して担当医の裁量で選択できるようにして、その選択理由とともに登録する方式によって、より精度の高い解析ができるような臨床試験を実施する。

患者側の希望
PBSCTのみ (理由:)
BMT/PBSCTいずれでも可

ドナー側の希望
PBSCTのみ (理由:)
BMT/PBSCTいずれでも可

移植前処置
CY-TBI
BU-CY
FLU-MEL FLU-MEL-TBI (Gy)
FLU-BU FLU-BU-TBI (Gy)
FLU-CY FLU-CY-TBI (Gy)
その他 ()

前処置選択理由
施設の標準前処置
高齢のため
臓器障害(障害)のため

GVHD予防法 (予防として投与を予定しているものをすべて選択)

- CSA TAC MTX
MMF PSL

CSA, TACを用いる場合、その投与方法、開始用量、目標血中濃度

- 開始用量 _____mg/kg
持続静注 (目標血中濃度 _____ng/ml)
1日2回点滴静注 (目標血中濃度 _____ng/ml) トラフ・0投与_時間後)
1日1回点滴静注 (目標血中濃度 _____ng/ml) トラフ・0投与_時間後)

MTXを用いる場合、その投与日と投与量

- 15 mg/m² (day 1) + 10 mg/m² (day 3,6,11)
10 mg/m² (day 1) + 7 mg/m² (day 3,6,11)
15 mg/m² (day 1) + 10 mg/m² (day 3,6)
10 mg/m² (day 1) + 7 mg/m² (day 3,6)
その他 (____mg/m² (day ____)+ (____mg/m² (day ____))

MMFを用いる場合、その投与日と投与量

- (____mg/m² (day ____ ~ ____))

CSAの減量開始予定日(GVHDの発症がない場合)

移植後 _____日

CSAの投与終了予定日(GVHDの発症がない場合)

移植後 _____日

今後、明らかにしていきたいこと

1. 前方視的情報収集



2. UR-PBSCTの移植方法の至適化



3. UR-BMTとの比較 (RCT?)

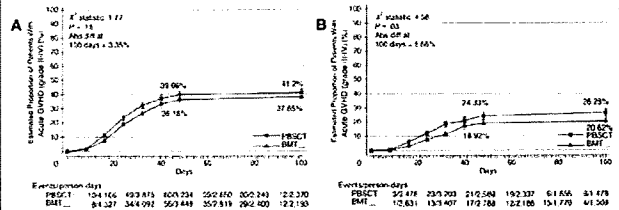
生存率のみならず、QOL、医療費についても。

血縁者間PBSCTvsBMT

	Event/Patients		Statistics		OR and 95% CI (PBSCT : BMT)	Odds Redn. (SD)
	PBSCT	BMT	(O-E)	Var.		
Survival	207/544	234/563	-13.5	99.6		13% (9); 2P = .2
Disease-free survival	223/544	270/564	-24.0	109.9		20% (9); 2P = .02
Relapse	96/542	132/558	-18.5	53.5		29% (12); 2P = .01
Relapse mortality	53/544	79/563	-13.2	31.5		31% (15); 2P = .02
Nonrelapse mortality	154/544	155/563	-0.4	71.0		1% (12); 2P = 1.0
aGVHD (II-IV)	227/520	213/541	12.7	95.3		-14% (11); 2P = .2
cGVHD (extensive)	189/483	122/490	38.8	61.1		87% (18); 2P < .0001
Neutrophil engraftment	516/530	528/555	-98.4	63.2		65% (6); 2P < .0001
Platelet engraftment	471/532	476/554	-86.7	131.5		48% (6); 2P < .0001

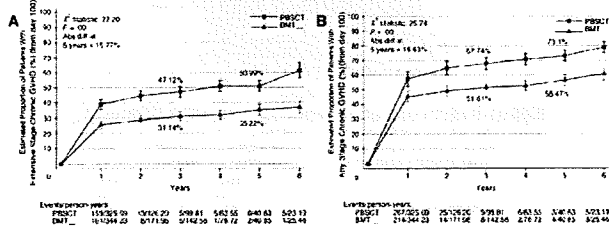
J Clin Oncol 23:5074-5087.

血縁者間PBSCTvsBMT



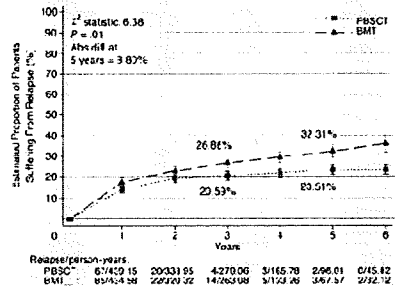
J Clin Oncol 23:5074-5087.

血縁者間PBSCTvsBMT



J Clin Oncol 23:5074-5087.

血縁者間PBSCTvsBMT



J Clin Oncol 23:5074-5087.

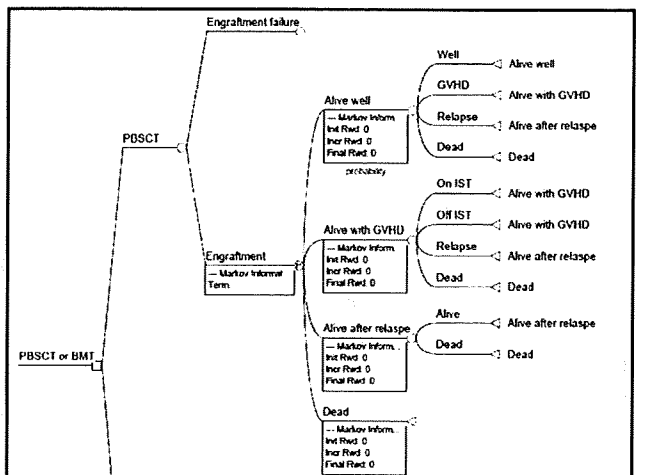
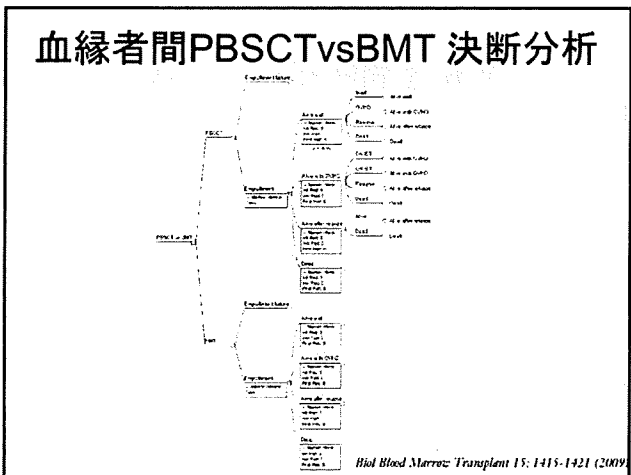
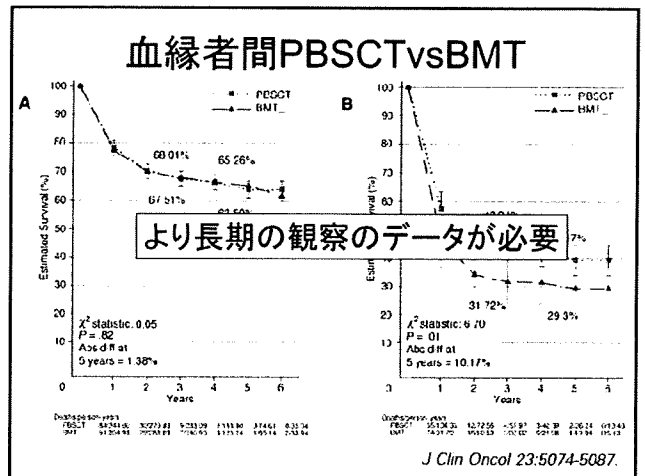
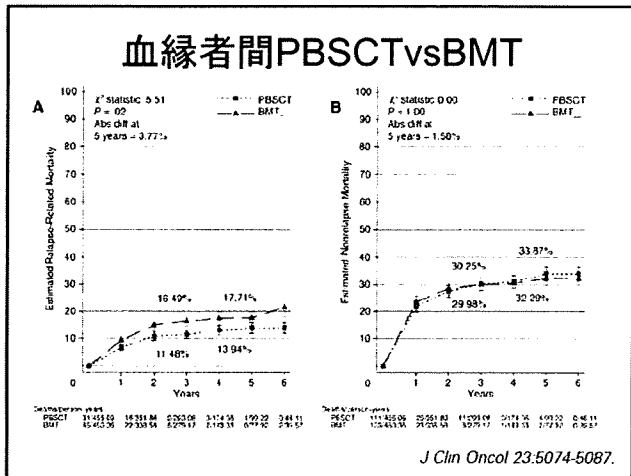
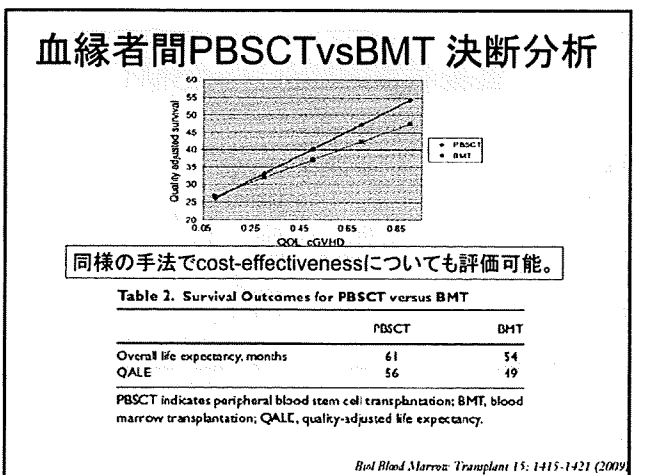


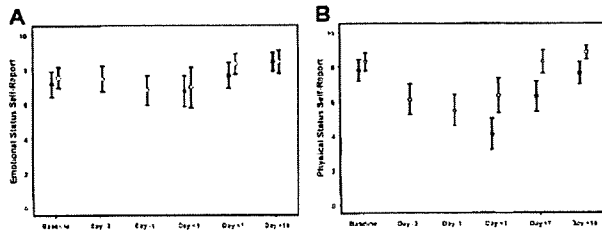
Table 1. Probability Estimates with Data Sources

Probability	Data Source	Estimate (PBSCT)	Adjusted for: Month Cycle Length (PBSCT)	Estimate (BMT)	Adjusted for: Month Cycle Length (BMT)	Range for: Sensitivity Analysis
Engraftment failure	Meta-analysis	0.03	0.03	0.05	0.05	0.01-0.08
cGVHD	Meta-analysis	0.412	0.137	0.379	0.126	0.12-0.8
Death from cGVHD	Meta-analysis	RR†earlyTRM	0.0125	RR†earlyTRM	RR†earlyTRM	RR†1-5
Relapse, year 1	Meta-analysis	0.153	0.0175	0.156	0.013	0-0.3
Relapse, year 2	Meta-analysis	0.06	0.005	0.069	0.0058	0.01-0.12
Relapse, year 3	Meta-analysis	0.0143	0.0012	0.053	0.0044	0.005-0.08
Treatment success cGVHD	Literature	0.4	0.067	0.4	0.067	0.25-0.75
cGVHD through year 1	Meta-analysis	0.59	0.098	0.45	0.075	0.05-0.7
cGVHD beyond through year 1	Meta-analysis	0.09	0.0075	0.08	0.0067	0.05-0.15
cGVHD complications through year 1	Meta-analysis	0.4	0.067	0.35	0.042	0.1-0.5
cGVHD complications beyond	Meta-analysis	0.05	0.0042	0.04	0.0033	0.01-0.06
Transplant complications	Literature	0.125	0.01	0.125	0.01	0.05-0.2
Treatment success cGVHD	Literature	0.3	0.0083	0.3	0.0083	0-0.7
Taper IST	Stewart et al. [32]	0.20	0.0054	0.4	0.011	0.05-0.5
Death from relapse, early	Meta-analysis	0.07	0.0058	0.1	0.0083	0.05-0.3
Death from relapse, late	Meta-analysis	0.045	0.00375	0.045	0.0034	0.04-0.08
Early TRM	Meta-analysis	0.135	0.01	0.135	0.01	0.05-0.2
Late TRM	Meta-analysis	0.02	0.0017	0.02	0.0017	0-0.1
Quality of life	Literature	exometes (see Methods)†		*exometes (see Methods)†		0-1.0
cGVHD complications	Meta-analysis	0.24	0.087	0.20	0.067	0.09-0.39
Death from cGVHD	Meta-analysis	RR†lateTRM		RR†lateTRM	RR†1-5	
Age, years	Base case	35		35		18-65
ASR mortality	Literature	U.S. standard ASR mortality		U.S. standard ASR mortality		

†cGVHD indicates acute graft-versus-host disease; cGVHD, chronic graft-versus-host disease; TRM, treatment-related mortality; IST, immunosuppressive therapy; RR, relative risk increase; ASR, ages/100.



ドナーのQOL (Seattle RCT)



(Blood. 2001;97:2541-2548)

ドナーのQOL (NMDP)

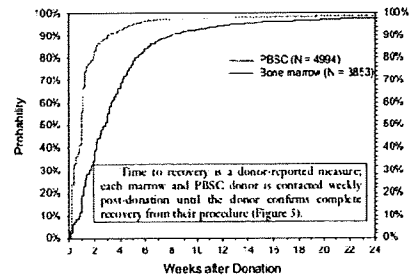


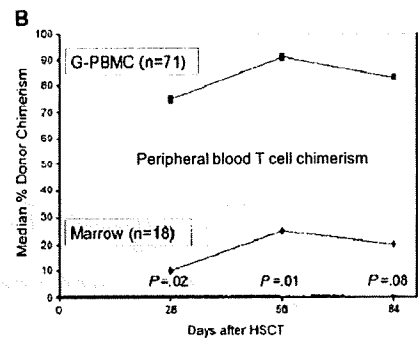
Figure 5. Kaplan-Meier plots of time to recovery from stem cell donation (first donations performed from November 2001 through March 2006).

Biology of Blood and Marrow Transplantation 14:19-36 (2008)

ドナープールの拡大

- 理想的にはBM、PBどちらでもよいと言えるドナーの増加。
- しかし、「PBなら・・・」というドナーがドナープールの増大に貢献する可能性は否定できない。
- まずはPBを入り口にして、PB採取、BM採取の両者を知っていただくことで、そのようなドナーが増えることを期待する。

RICT, NST from UR-donor



(Blood. 2003;102:2021-2030)

平成20年度 全国調査報告書

2.3.3c. 非血縁者からの移植・骨髄 UR-BMT

年齢 (歳)	'91	'96	'97	'98	'99	'00	'01	'02	'03	'04	'05	'06	'07	合計 (Total)
0~4	67	27	31	11	10	20	31	26	26	26	26	39	23	385
5~9	60	31	11	38	43	55	46	36	46	37	38	26	26	527
10~14	108	35	28	42	35	17	11	39	42	43	37	30	30	527
15~19	155	57	51	73	72	65	65	18	45	44	43	45	45	716
20~24	129	57	62	65	71	55	53	10	32	35	45	42	42	716
25~29	105	46	62	62	70	50	62	50	42	57	49	53	53	716
30~34	110	36	50	64	59	82	69	61	62	67	59	51	51	716
35~39	95	32	43	50	67	79	68	57	75	71	74	71	71	791
40~44	88	34	40	50	70	84	60	50	68	66	81	67	67	757
45~49	40	28	37	45	70	76	71	85	59	95	81	91	91	778
50~54	9	7	8	17	51	39	71	72	78	87	87	101	101	655
55~59	0	0	0	6	9	19	27	50	71	91	110	127	127	510
60~64	0	0	0	1	1	4	3	16	30	59	46	61	61	220
65~69	0	0	0	0	0	1	2	5	8	14	12	15	15	58
70~74	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	2	1
75~79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80~84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
85~89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90~95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
不明	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合計 (Total)	1,006	390	446	535	669	706	975	611	684	793	893	819	819	8,158

非血縁者間移植数増加の最大の要因

UR-PBSCTの導入によって

- ドナーQOLの改善
- 非血縁ミニ移植の拡大
- 細胞療法への応用(多数の幹細胞、T細胞)
- 緊急時の対応(貯血が不要)

末梢血幹細胞非凍結での移植 の経験

都立駒込病院 造血細胞移植チーム
坂巻壽、奥山美樹、比留間潔

背景・目的

同種造血幹細胞移植の幹細胞源として末梢血幹細胞 (PBSC) の有用性が高まりつつあるが、十分なCD34陽性細胞の得られないドナーが少なからず存在することから、数日間にわたり採取、凍結保存して十分な細胞数を確保してから移植されることが多い。しかし、適切な移植細胞数に関しては必ずしも定まっているとは言えない。

当院では原則、採取末梢血は凍結保存せずに移植を行ってきた。採取末梢血を凍結保存せずに移植を行った症例を後方視的に解析したので報告する。

駒込病院における非凍結末梢血CD34+細胞を用いた同種移植

対象および方法

- ◆ 1996年6月～2009年12月、同種PBSCT (RISTを除く) 72例。

患者年齢；中央値37才 (17～60才)

患者性別；男/女=47/25

AML 31例 MDS 5

ALL 15 MM 4

NHL 8 SAA 2

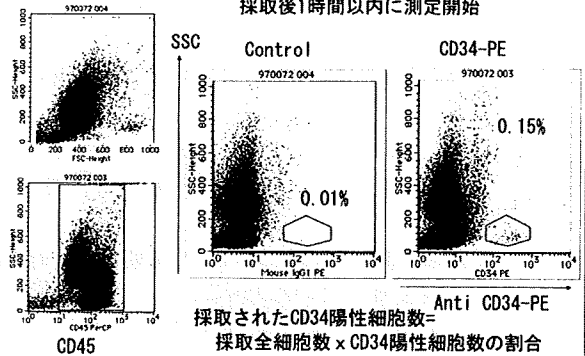
CHL 7

- ◆ ドナーはHLA一致の血縁者で、G-CSF 10 μ g/kg/dayを皮下注射し投与4～5日後にCobe Spectraで1～2日間PBSCを採取した。処理量は150～200 ml/kg (ドナー体重)。

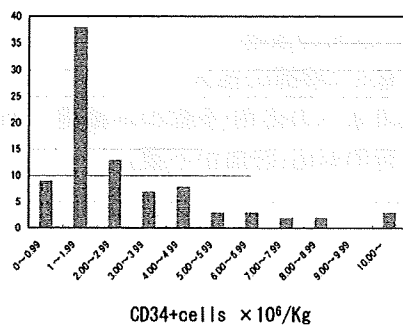
CD34+細胞数は2x10⁶/kgを目標、1x10⁶/kgを最少限度とすることを目安に採取した。

末梢血幹細胞中のCD34陽性細胞測定法

採取後1時間以内に測定開始



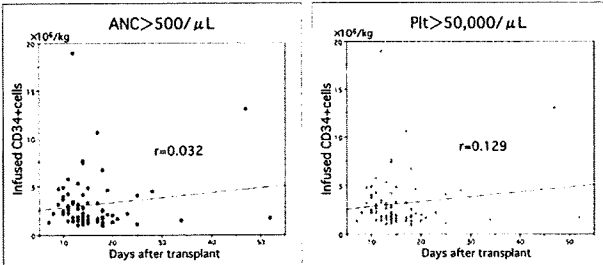
採取されたCD34陽性細胞数の度数分布



初日採取細胞数の少なかったケースでの 最終輸注細胞数

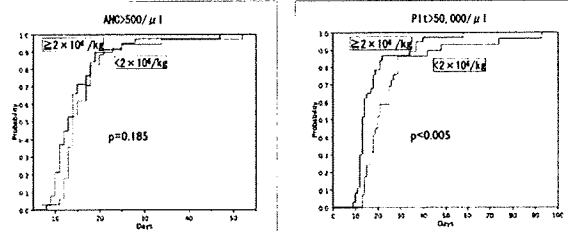
1日目採取CD34細胞数 (X10 ⁶ /kg)	2日目採取CD34細胞数 (X10 ⁶ /kg)	移植CD34陽性細胞数 (X10 ⁶ /kg)
0.28	0.81	1.09
0.39	1.41	1.8
0.58	0.84	1.42
0.65	1.03	1.68
0.67	0.32	0.99
0.75	0.38	1.13
0.93		0.93
0.95	1.21	2.16
0.98	0.85	1.83

輸注CD34+細胞と造血回復

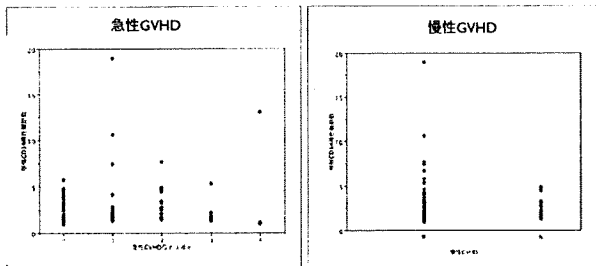


輸注CD34+細胞と造血回復

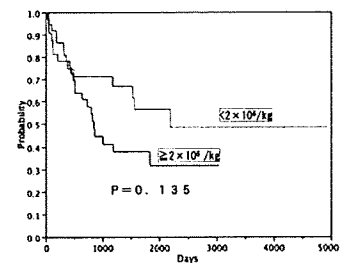
CD34+ < 2.0 x 10⁶ と CD34+ ≥ 2.0 x 10⁶ の比較



輸注CD34+細胞とGVHD



輸注CD34+細胞と生存率



まとめ

- ◆ 72回の移植の内、ドナーから2日にわたり採取したのは14例であった。
- ◆ 輸注されたCD34+細胞数は中央値2.16 X10⁶/Kg (0.93~18.92 X10⁶/Kg)
- ◆ 全例で生着を認めた。
- ◆ CD34+細胞>2.0 X10⁶/Kg輸注された症例では血小板の回復が有意に促進されたが、好中球数の回復には有意差を認めなかった。
- ◆ 急性・慢性GVHDとも輸注されたCD34+細胞数との相関は認めなかった

VIII. 研究成果の刊行物・印刷

Long-Term Donor-Specific Tolerance in Rat Cardiac Allografts by Intrabone Marrow Injection of Donor Bone Marrow Cells

Kequan Guo,^{1,2} Muneo Inaba,^{1,3,4} Ming Li,¹ Jun An,⁵ Wenhao Cui,¹ Changye Song,¹ Jianfeng Wang,¹ Yunze Cui,¹ Yutaku Sakaguchi,¹ Masanobu Tsuda,¹ Mariko Omae,¹ Yugo Ando,¹ Qing Li,¹ Xiaoli Wang,¹ Wei Feng,¹ and Susumu Ikehara^{1,3,4,6}

Background. Donor-specific central tolerance in cardiac allograft can be induced by hematopoietic chimerism via conventional intravenous bone marrow transplantation (IV-BMT). However, there are problems with IV-BMT, such as the risk of graft failure and of the toxicity from conditioning regimens.

Methods. A new method for heart transplantation is presented. This method consists of administration of fludarabine phosphate (50 mg/kg) and fractionated low-dose irradiation (3.5 Gy×2 or 4.0 Gy×2), followed by intrabone marrow injection of whole bone marrow cells (IBM-BMT) plus heterotopic heart transplantation.

Results. Cardiac allografts with IBM-BMT were accepted and survived long-term (>10 months) showing neither acute rejection nor chronic rejection including cardiac allograft vasculopathy by such conditioning regimens. In contrast, cardiac allografts with conventional IV-BMT were rejected within 1 month after the treatment with irradiation of 3.5 Gy×2 or within 3 months after the treatment with irradiation of 4.0 Gy×2. Macrochimerism (>70%) was favorably established and stably maintained by IBM-BMT but not IV-BMT. Low levels of transient mixed chimerism (<7%) were induced by IV-BMT with fludarabine plus 4.0 Gy×2, but the chimerism was lost within 1 month after the treatment.

Conclusions. These findings indicate that IBM-BMT is a feasible strategy for the induction of persistent donor-specific tolerance, enables the use of reduced radiation doses as conditioning regimens, and obviates the need for immunosuppressants.

Keywords: Tolerance induction, Heart transplantation, Intrabone marrow injection, Bone marrow transplantation.

(*Transplantation* 2008;85: 93–101)

Despite recent advances in immunosuppressive agents, chronic rejection and side effects associated with the long-term usage of nonspecific immunosuppressants remain a barrier to successful clinical solid organ transplantation (1). Mixed hematopoietic chimerism has proven its efficacy in the induction of persistent tolerance in rodents, large animals (including nonhuman primates) and recently a few renal patients by conventional intravenous (IV) bone marrow transplantation (BMT) (2–4). However, obstacles that hinder the

clinical application of BMT as a feasible strategy for inducing tolerance in a clinical setting include the toxicity of conditioning regimens, the risk of graft failure, and the problem of graft-versus-host disease (GvHD) (5).

Recent studies in animal models have therefore aimed at minimizing conditioning and optimizing selective immunosuppression. Included in these approaches is the use of nonmyeloablative conditioning regimens, T-cell depletion, donor lymphocyte infusion, and blockade of stimulatory and costimulatory pathways (6–9). We have recently found that the injection of donor bone marrow cells (BMCs) directly into the bone marrow cavity (intrabone marrow BMT [IBM-BMT]) induces persistent donor-specific tolerance in mice even if the radiation doses are reduced to sublethal levels (10). IBM-BMT also enhances the rapid recovery or reconstitution of the hematolymphoid system (including bone marrow stromal cells) of donor origin, resulting in the complete amelioration of autoimmune diseases in MRL/lpr mice, in which conventional IV-BMT had been unsuccessful (10). It is of interest that the recipients treated with IBM-BMT have no clinical or histopathological signs of GvHD or graft failure (10, 11). In addition, we have more recently extended this new approach to the induction of tolerance in the transplantation of the leg (12), lung (13), and pancreatic islets (14) in rats. Therefore, the new BMT method (IBM-BMT) seems to have significant advantages in achieving successful allogeneic organ transplantation.

It has been reported that fludarabine eliminates normal and malignant mononuclear cells in animals and humans through the inhibition of DNA synthesis. It has also been shown to have cytotoxic effects on lymphoid cells (15), particularly T cells (16). Furthermore, the prior injection of flu-

This work was supported by a grants from Haiteku Research Center of the Ministry of Education; the Millennium, 21st Century Center of Excellence, and the Science Frontier programs of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology; Health and Labor Sciences [(B)11470062, (A)10181225, and (A)11162221]; the Department of Transplantation for Regeneration Therapy; Molecular Medical Science Institute, Otsuka Pharmaceutical; and the Japan Immunoresearch Laboratories.

¹ First Department of Pathology, Kansai Medical University, Moriguchi City, Osaka, Japan.

² Department of Cardiac Surgery, the Medical School Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, China.

³ Transplantation Center, Kansai Medical University, Moriguchi City, Osaka, Japan.

⁴ Regeneration Research Center for Intractable Diseases, Kansai Medical University, Moriguchi City, Osaka, Japan.

⁵ Department of Cardiac Surgery, First Hospital Affiliated to Jilin University, Changchun, Jilin, China.

⁶ Address correspondence to: Susumu Ikehara, M.D., Ph.D., First Department of Pathology, Kansai Medical University, 10–15 Fumizono-cho, Moriguchi City, Osaka 570-8506, Japan.

E-mail: ikehara@takii.kmu.ac.jp

Received 29 March 2007. Revision requested 25 July 2007.

Accepted 23 September 2007.

Copyright © 2008 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/08/8501-93

DOI: 10.1097/01.tp.0000296061.71662.76

darabine has proven to facilitate the establishment of high levels of hematopoietic chimerism with low doses of irradiation, as shown in our previous leg (12) and pancreatic islet transplantation (14). In view of both its selective lympholytic activity (especially to eliminate donor-reactive T cells in the recipients) and relatively mild side-effect profile (17), we have used this immunosuppressive agent as a part of our nonmyeloablative conditioning regimens.

In the present study, we report that the combination of the injection of fludarabine, low-dose fractionated irradiation, and IBM-BMT provides a feasible clinical strategy for inducing permanent tolerance without using any immunosuppressants.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Brown Norway (BN: RT1^{bn}), Fischer 344 (F344: RT1^l), and PVG (PVG: RT1^c) rats were purchased from SLC (Shizuoka, Japan) and maintained until use in our animal facilities under specific pathogen-free conditions. BN rats at the age of 8–10 weeks were used as recipients, and F344 rats at the age of 8–10 weeks were used as donors for the transplantations of the heart, skin, and BMCs. PVG rats were used as third party stimulators in mixed leukocyte reactions (MLRs). All animal research was reviewed and approved by the Animal Experimentation Committee, Kansai Medical University.

Heterotopic Heart Transplantation

Heterotopic heart transplantation was performed, as described by Tomita Y (18). Briefly, after induction of anesthesia with intraperitoneal injection of sodium pentobarbital, vascularized heart transplantation was performed heterotopically into the right cervical portion of recipients using a microsurgical cuff technique. Donor hearts were procured and stored in a cold saline bath. The donor brachiocephalic artery and main pulmonary artery were anastomosed with the recipient right common carotid artery and right external jugular vein, respectively. Allograft survival was assessed by daily palpation. Graft rejection was defined as complete cessation of spontaneous ventricular contraction.

Experimental Protocol for BMT

BN rats were injected intravenously with 50 mg/kg of fludarabine phosphate, followed by fractionated whole body irradiation (3.5 Gy×2 to 5.0 Gy×2) by ¹³⁷Cs (Gammacell 40 Exactor; Nordion International Inc, Ontario, Canada) 1 day before the bone marrow and heart transplantation (day -1). As described previously (11), BMCs (3×10⁷ or 10×10⁷ cells/60 μL) obtained from the femurs and tibias of donor F344 rats were injected intravenously (IV-BMT) or directly into the bone marrow cavity (IBM-BMT) of the left tibia of the recipient BN rats on day 0, and the cardiac allografts from F344 rats were implanted simultaneously. In terms of the IBM-BMT technique, the knee was flexed to 90 degrees and the proximal side of the tibia was drawn to the anterior. A 26-gauge needle was inserted into the joint surface of the tibia through the patellar tendon and then inserted into the bone cavity.

Analyses for Cell Surface Antigens

Spleen cells, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), and BMCs from the recipient rats were stained

with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated rat antiRT1^l monoclonal antibody (mAb; PharMingen, San Diego, CA) to identify the donor-derived cells, and purified mouse antiRT1^{bn} mAb (Serotec Ltd., Oxford, United Kingdom) followed by phycoerythrin (PE)-conjugated goat antimouse immunoglobulin G (Serotec Ltd.) to identify the recipient-derived cells. Donor-derived cells bearing a lineage-specific phenotype were also analyzed by FITC-antiRT1^l mAb plus PE-conjugated mAb against CD45R (B220) (PharMingen), CD4, CD8, or CD11b (Caltag Laboratories, Burlingame, CA). The stained cells were analyzed by a FACScan (Becton Dickinson & Co., Mountain View, CA).

Mixed Leukocyte Reactions

MLRs were performed as described previously (13). Briefly, the responder spleen cells (2×10⁵) were cultured with 2×10⁵ irradiated (12 Gy) stimulator spleen cells from F344, BN, and PVG rats for 72 hr and pulsed with 0.5 μCi of [³H]-thymidine for the last 16 hr of the culturing period.

Skin Transplantation

Full-thickness F344 donor or PVG third-party skin grafts of 2×3 cm were prepared and transplanted with 6–0 Prolene on the dorsolateral thorax of BN recipient rats. Grafts were secured with sutures and covered with sterile gauze and an elastic protective tape. The first inspection was carried out on the seventh day, followed by daily inspections for 3 weeks. The graft rejection was defined as the complete loss of viable epidermal graft tissue when more than 50% of the graft became raised, necrotic, or covered by eschar.

Histological Studies

Fresh heart necropsy tissue was fixed in 10% formalin for 48 hr and embedded in paraffin according to standard procedures. Three-micrometer-thick sections were stained with hematoxylin and eosin (H-E), Elastica-van Gieson's (EvG), and Masson's trichrome (MT). Anti- α -smooth muscle actin (α -SMA) mAb (DAKO A/S, Denmark) was used for immunohistochemical staining. Furthermore, the frozen specimens were also prepared for fluorescent staining using FITC-conjugated rat antiRT1^l mAb (PharMingen) and purified OX-62 mAb, reactive to rat dendritic cells (DCs) and integrin α _E chain (PharMingen), followed by PE-conjugated goat antimouse immunoglobulin G (Serotec Ltd.) to identify the donor-derived DCs in the recipient thymus by a confocal laser scanning microscope (LSM-GB200; Olympus, Tokyo, Japan). To determine GvHD, the liver, intestine, and skin were also histologically examined after H-E staining.

Statistical Analysis

Statistical analysis of the survival rate of the cardiac allografts was performed using a log-rank test. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant using Student's *t* test.

RESULTS

Establishment of Hematopoietic Chimerism after IBM-BMT

We first determined not only the number of donor BMCs (for injection) but also the conditioning regimens for