

検査項目の拡大

細菌16S rRNA遺伝子による細菌の迅速検出系の作成

1. プライマー・プローブ配列の設定

検査に使用するプライマーは、ARB sequence data base の16S rRNA gene配列41,016種類において64%完全一致しているものを採用した。
実際には1塩基程度の違いであれば検出可能と考えられるので、検出できる種類は64%を大きく上回ると考えられる。

Primer: F-agcagcagctDRggaaat Primer: R-ggactactVggttatctaat
Probe: FAM-tgcccgagccgagctaatcaRDag-iowaBK

2. 感度検定用スタンダードの作成と感度検定

Staphylococcus aureus のDNAを使用。PCR産物をpGEM-T Easy Vector にクローニングし、シーケンス解析により配列を確認した。MS2RNA溶液10ng/ μ lに段階希釈し、感度検定用スタンダードとして感度検定を行ったところ、10コピー/Reactionの感度だった。

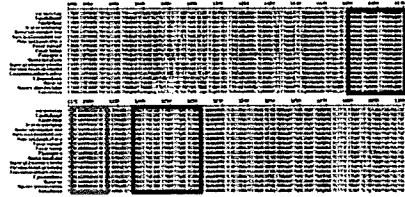
3. 実際の菌を用いた検出可能細菌の検討

6種類の細菌（大腸菌、放線菌、肺炎桿菌、肺炎球菌、緑膿菌、コアグラネジ陰性ブドウ球菌）に関して10コピー/Reactionの感度で検出可能なことを確認した。

検査項目の拡大

真菌18S rRNA遺伝子による真菌の迅速検出系の作成

真菌の18SリボソームRNA遺伝子には多くの真菌種に共通な領域が存在する。この領域にプライマー・プローブを設定して真菌のブロードレンジ定量PCR系の構築を試みた。代表的な真菌の18S rRNA遺伝子領域をアライメントし、共通領域に下記に示すようなプライマー・プローブを設定した。



Primer F-gcaaggctgaacttaagRaatg Primer R-ccccgttgatcaaatnagg
Probe FAM-cggAgGgcAcCa-TAMRA

検査項目の拡大

TTV (Torque Teno Virus)

肝炎患者のTT由来のサンプルより分離された直径30-32nmの小型球形ウイルスで血液中では主としてIgGと結合し免疫複合体を形成している

肝臓を主要な増殖部位とする環状1本鎖(マイナス鎖)DNAウイルス

日本では健康人の80-90%に持続感染していると報告されている

TTV感染の臨床的意義はまだまだ未解明

XMRV (Xenotropic murine leukemia virus-related virus)

前立腺がん患者よりGene chip を使用して同定・分離

米国では、3.4%の健康人に持続感染していると報告されている

リンパ球系の細胞に実験的に感染することが可能

最近、慢性疲労性症候群との関連が指摘されている

★ TTV 検出系の作成

TTV ORF2 領域

Forward Primer - TCCGAATGGCTGAGTTT
Reverse Primer - CGAATTGCCCTTGACT
Probe - FAM- ACTCACCTHCGGCACCCGC-iowaBK

★ XMRV 検出系の作成

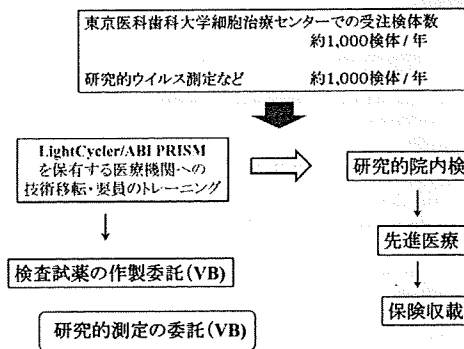
Genbankに登録されているVP62(DQ399707), VP35(DQ241301), VP42(DQ241302), VP62(EF185282, DQ399707)株の遺伝子配列をBLAST解析し、最も特異性の高いと思われる領域に下記Primer, Probeを設定

Forward Primer - ATGTGACTGAGACCTGCACCG(4862-4883)
Reverse Primer - ACTTCCTGAAATCAACTTCCC(4982-4960)
Probe - 6FAM-TGCCGAGTACGGGACATCGGC-iowaBK
(4926-4947: VP62(DQ399707))

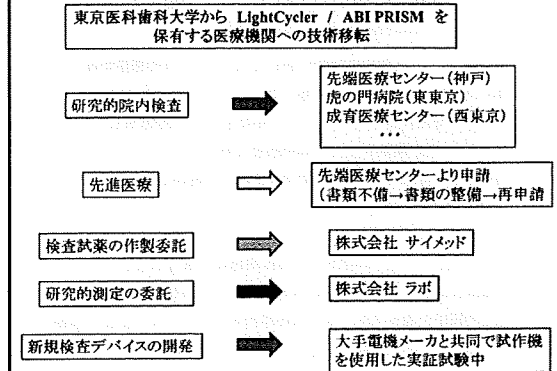
★ PCR条件

95°C0秒: Denature
95°C0秒、60°C20秒の2ステップPCRを50サイクル
使用機器: Light Cycler 2.0 (Roche)

網羅的病原体検査系の実用化：検査可能施設の拡大



網羅的病原体検査系の実用化：検査可能施設の拡大



臍帯血移植における HLA 不一致が CMV 再活性化に与える影響に関する検討

医科研 高橋 聡

臍帯血移植後の CMV に対する細胞性免疫の再構築とウイルス再活性化および感染症発症との関係は不明な点が多い。我々は、関東造血幹細胞共同研究ループ (KSGCT、会長：岡本真一郎慶応大学教授) との共同研究として、成人患者に対する臍帯血移植の多施設共同前方視的臨床研究をおこなった。本共同研究の付随研究として、2006 年から 2008 年までの間に統一臨床プロトコールに基づいた方法で臍帯血移植を受けた 20 名と、同時期に医科研において同一法で移植を行った 19 名、合計 39 名の成人患者におけるウイルス特異的細胞性免疫の回復動態について解析を行った。

IFN- γ を指標とした細胞内染色でウイルス反応性 CD4 陽性 T 細胞は移植後 4 ヶ月までで 92% の患者で検出された。また、ウイルス反応性 CD8 陽性 T 細胞あるいはウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞 (テトラマーアッセイによる) は、移植後 4 ヶ月の段階でそれぞれ 75% と 50% の陽性率であった。さらに、患者-臍帯血間の HLA の違いと抗原特異的細胞性免疫の回復動態との間には相関は認めなかった。さらに、医科研の症例の解析では、細胞性免疫回復とウイルス抗原血症の陽性率との間との関連は認めなかった。

臍帯血中のナイーブ成熟 T 細胞は、移植後早期に抗原刺激を受けた後、HLA 不一致度の程度に影響を受けずに抗原特異的な免疫反応を担う可能性が示唆された。

再移植における
HHV6脳炎/脊髄炎

九州大学病院 病態修復内科学
森康雄、宮本敏浩、豊嶋崇徳

久留米大学病院 血液内科
長藤宏司

【背景】

- ✓ 同種移植後の中枢神経系合併症として、HHV6再活性化に伴う脳炎/脊髄炎が知られる。
- ✓ 近年、臍帯血移植の普及とともにHHV6脳炎/脊髄炎の報告が増加しており、注目を集めている。
- ✓ 2002年1月～2009年10月に当科で同種造血幹細胞移植を施行された228例を後方視的に解析した。

【HHV6脳炎発症の危険因子】

- ・ HLA-mismatched / unrelated donor
- ・ Cord Blood Transplantation
- ・ RIST
- ・ ATG usage
- ・ GVHD and/or corticosteroids

【診断】

- ① 髄液中HHV6 DNAの検出 (PCR)
or
- ② 特徴的臨床所見 (記憶障害etc)
MR所見 (limbic encephalitis)
末梢血HHV6 DNAの検出
3項目のうち2項目以上を満たす

【患者背景】

Characteristics	Total	HHV6 (+)	HHV6 (-)
	228	13 (5.7%)	215
Sex (M/F)	136/92	10/3	126/89
Underlying disease			
MDS/AML	92	7	85
CML	13	0	13
ALL	31	1	30
ML	27	1	26
ATL	30	3	27
AA	14	1	13
others	21	0	21
Status at SCT			
early/non-early	101/127	4/9	97/118

【HHV6脳炎発症の危険因子】

	Total	HHV6 (+)	HHV6 (-)	p-value
	228	13	215	
Conditioning				
Convent.	133	4 (3.0%)	129	0.038
RIC	95	9 (9.5%)	86	
Graft				
RPB	71	2 (2.8%)	69	0.0005
RBM	15	0 (0%)	15	
URBM	91	3 (3.3%)	88	
CB	51	8 (15.7%)	43	
HLA match				
≤4/6	52	6 (11.5%)	46	0.012
5/6	47	4 (8.5%)	43	
6/6	129	3 (2.3%)	126	

【HHV6脳炎発症の危険因子】

	Total	HHV6 (+)	HHV6 (-)	p-value
	228	13	215	
GVHD prophylaxis				
CI	20	2	18	<0.0001
CI + sMTX	193	5	188	
CI + MMF	15	6	9	
Times of SCT				
1st	169	6 (3.6%)	163	0.018
2nd & 3rd	59	7 (11.9%)	52	
Prior SCT				
auto	26	2	24	N.C
allo	35	5	30	

【HHV6脳炎/脊髄炎症例】

patient	graft source	condition	onset (day)	prior/concom	
				PIR	HPS
1	1st R-PBSC	Conv	614	+	-
2	1st UR-BM	Conv	61	+	-
3	1st CBT	RIC	23	+	-
4	1st UR-BM	Conv	19	+	-
5	1st R-PBSC	Conv	24	+	+
6	1st CBT	RIC	19	+	-
7	2nd CBT	RIC	35	+	-
8	2nd UR-BM	RIC	22	+	-
9	2nd CBT	RIC	27	+	-
10	2nd CBT	RIC	19	+	+
11	2nd CBT	RIC	23	+	+
12	2nd CBT	RIC	14	+	-
13	3rd CBT	RIC	17	+	-

【HHV6脳炎/脊髄炎症例】

patient	source	CNS manifestation	HHV6 viral load		
			CSF	PB	MRI
1	1st R-PBSC	encephalitis	2 x 10 ⁴	N.A	limbic
2	1st UR-BM	encephalitis	2 x 10 ²	N.A	None
3	1st CBT	combined	2 x 10 ⁴	N.A	limbic
4	1st UR-BM	combined	2 x 10 ⁵	N.A	limbic
5	1st R-PBSC	combined	N.A	7 x 10 ³	limbic
6	1st CBT	CIPS-like	5 x 10 ⁴	N.A	None
7	2nd CBT	combined	N.A	Neg	limbic
8	2nd UR-BM	combined	N.A	4 x 10 ⁵	None
9	2nd CBT	combined	9 x 10 ³	3 x 10 ³	limbic
10	2nd CBT	combined	2 x 10 ⁴	1 x 10 ⁴	limbic
11	2nd CBT	CIPS-like	N.A	8 x 10 ³	None
12	2nd CBT	CIPS-like	1 x 10 ³	8 x 10 ³	None
13	3rd CBT	CIPS-like	2 x 10 ⁵	N.A	None

Calcineurin inhibitor induced pain syndrome (CIPS)

Incidence

- about 1~2% in solid organ transplantation
- unclear in HSCT (only 7 case reports)

Pathophysiology

- bone marrow edema induced by vascular endothelial damage ?
- triggered by high concentration of the calcineurin inhibitor ? (need for differential diagnosis from PRES induced by CIs)

Symptom

- sudden electric shock-like bilateral lower limb pain
- itching preceding to the onset of pain.
- generally negative clinical examination.
- MRI : bone marrow edema sharply limited in the painful area

【HHV6脳炎/脊髄炎症例】

patient	source	antiviral treatment	outcome
2	1st UR-BM	GCV + FCV	dead by GVHD
3	1st CBT	GCV + FCV	dead by sepsis
4	1st UR-BM	GCV + FCV	dead by GVHD
5	1st R-PBSC	GCV + FCV	dead by relapsed AML
6	1st CBT	FCV	survive with CIPS-like disesthesia
7	2nd CBT	ACV	dead by HHV6 encephalitis
8	2nd UR-BM	GCV + FCV	dead by sepsis
9	2nd CBT	GCV + FCV	dead by donor-derived MDS
10	2nd CBT	GCV + FCV	dead by relapsed AML
11	2nd CBT	FCV	dead by relapsed AML
12	2nd CBT	GCV + FCV	survive with CIPS-like disesthesia
13	3rd CBT	GCV + FCV	survive w/o neurological complication

【HHV6脳炎/脊髄炎発症のodds ratio】

Characteristics	odds ratio (95% CI)	p-value	
Age	1.000 (0.954 - 1.048)	0.988	
Sex	male vs. female	1.799 (0.464 - 6.982)	0.396
Underlying disease	lymphoid vs. others	1.312 (0.388 - 4.443)	0.662
Disease status	non-early vs. early	1.385 (0.393 - 4.876)	0.612
Conditioning	RIC vs. myeloablative	2.491 (0.707 - 8.777)	0.155
Stem cell source	non-CB	1 (reference)	-
	CB (previous SCT -)	1.052 (0.119 - 9.313)	0.964
	CB (previous SCT +)	13.58 (3.447 - 53.52)	< 0.001
HLA	mismatched vs. matched	1.933 (0.542 - 6.889)	0.309
	GVHD prophylaxis	CI alone	1 (reference)
	CI plus sMTX	0.197 (0.035 - 1.107)	0.065
	CI plus MMF	2.800 (0.427 - 18.38)	0.283

【結果①】

- ✓ 228例中13例(5.7%)でHHV6脳炎を発症した。発症日中央値はday23で、10例は好中球生着後10日までに発症した。
- ✓ 初回移植症例は3.6%、2回以上の移植では11.9%の発症を認めた。
- ✓ 臍帯血移植15.7%と、骨髄(2.8%)や末梢血(2.8%)移植よりも高率に発症した。2回以上の臍帯血移植では28.6%と高率にHHV6再活性化を認めた。

【結果②】

- ✓ 13例のHHV6脳炎中、2例が短期記憶障害等の典型的なHHV6脳炎症状を呈したのに対し、4例ではCIPS様の四肢疼痛・掻痒感のみの症状を呈し、7例は双方の症状を呈した。CIPS症状のみの4例ともMRでは異常所見を認めず髄液検査が診断に必須であった。同種移植後にCIPS様の疼痛や掻痒感を呈する症例では、HHV6脳炎/脊髄炎を鑑別する必要がある。

【結果③】

- ✓ HHV6ウイルス量と症状の重症度やMR所見の有無に相関は認めなかった。
- ✓ HHV6脳炎/脊髄炎発症例は全例に先行するPIRがあり、3例では引き続きHPSを合併した。
- ✓ GCV+FCVの併用療法は有効であるが、神経学的後遺症は遷延することが多い。HHV6脳炎/脊髄炎を発症した症例は、予後不良の傾向にあった。

【結語】

- ✓ 再移植として施行する臍帯血ミニ移植がHHV6脳炎/脊髄炎発症の危険因子である。
- ✓ 臍帯血ミニ移植後に頻度の高いPIRやHPSなどの過剰な免疫応答が、HHV6脳炎/脊髄炎発症に関与している可能性が示唆される。

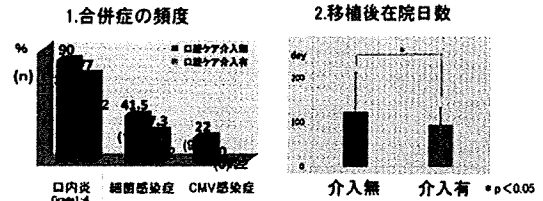
厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業
 「同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有およびドナーとレシピエントのQOLを視野に入れた成績の向上に関する研究」班(谷口班)
 平成21年度第2回合同班会議
 2010年1月31日 於:東京医科歯科大学

造血幹細胞移植後の口内炎に関する検討 ~口腔ケアチーム介入の有用性について~

北海道大学病院造血細胞治療センター/血液内科
 杉田純一(sugitaj@gmail.com)、今村雅寛
 北海道大学病院歯科診療センター
 阿部貴恵(keka-224@den.hokudai.ac.jp)、柏崎晴彦

背景

北海道大学病院では2006年3月に口腔ケアチームを立ち上げ、造血幹細胞移植患者への口腔ケアを実施している。昨年の第31回造血細胞移植学会では口腔ケアチームの介入により骨髄移植患者において口内炎を含めた合併症の頻度が低下すること、移植後在院期間が低下することを報告した。



背景

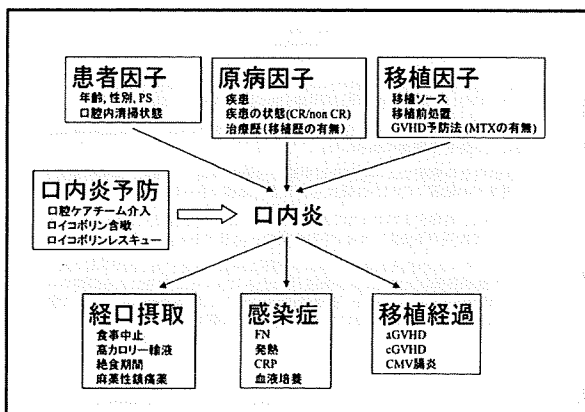
口腔ケアチームの参加により口内炎のより正確な評価が可能となったことを踏まえ、口腔ケアチーム介入後の移植症例における口内炎のリスクファクター、口内炎の存在が移植経過に与える影響およびロイコポリン含嗽、ロイコポリンレスキューなどの介入効果について検討を行った。

方法

2006年3月1日から2009年8月31日に当院にて同種造血幹細胞移植を施行した143例中、生着不全の15例、生着不全に対する再移植の7例、口内炎データ不十分の8例を除いた、113例を対象として後方視的な解析を行った。

当院における口腔ケアチーム

- ・発足
2006年3月に歯科診療センターにて立ち上げ
- ・チーム構成
歯科医師、看護師、歯科衛生士、薬剤師、管理栄養士
- ・目的
移植前の口腔感染源の除去
移植中・後の口腔管理
- ・口腔ケアチームの活動
移植症例毎の医師を含む症例検討
週1回の無菌室への住診(口内炎の早期発見・治療、口腔乾燥に対する対処)
月1回の歯科外来での症例検討

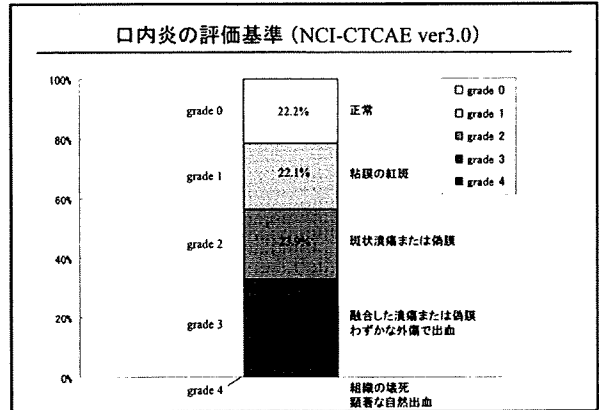


患者背景

年齢中央値(範囲)	47歳(17-73)
男性/女性	男性: 59例、女性: 54例
移植疾患	AML 44例 ALL 21例 MDS 9例 CML 5例 (AP:1例, BC:4例) HL 2例 NHL 22例 MM 3例 ATL 2例 AA 4例 MF 1例
移植前病態	CR 64例 nonCR 34例 評価不能 15例 (MDS, CML-AP, AA, MF)

患者背景

移植ソース	Allo-BM	13例	
	Allo-PBSC	10例	
	UR-BM	80例	
	UR-CB	10例	
移植前処置	CST	53例	VP-CY-TBI 24例
	RIST	60例	CY-TBI 20例
			その他 9例
GVHD 予防	CsA + MTX	39例	FLU-BU-TBI 49例
	FK + MTX	71例	その他 11例
	FK単独	1例	
生着中央値(範囲)	day15 (11-27)		
aGVHD	grade II-IV	45例	
	grade III-IV	10例	
cGVHD	limited	23例	
	extensive	24例	
overall survival (2yr)		70.6%	



口内炎のリスクファクター (grade3以上)

年齢	50歳未満	20/67 (26.1%)	50歳以上	16/56 (34.8%)	NS
	60歳未満	31/99 (31.3%)	60歳以上	5/14 (35.7%)	NS
性別	男性	16/59 (27.1%)	女性	20/54 (37.0%)	NS
PS	PS : 0,1	34/110 (30.9%)	PS : 2	2/3 (66.7%)	NS
移植前病態	CR	23/64 (35.9%)	non CR	10/34 (29.4%)	NS
移植ソース	BMT : 30/93 (32.3%)	PBSCT : 3/10 (30.0%)	CBT : 3/10 (30.0%)		NS
移植前処置	CST	17/53 (32.1%)	RIST	19/60 (31.7%)	NS
	VP-CY-TBI	11/24 (45.8%)	CY-TBI	2/20 (10.0%)	p < 0.01
好中球減少期間 (好中球 < 500/μl)	21日未満	21/85 (24.7%)	21日以上	15/28 (53.6%)	p < 0.01

CV-TBIと比較しVP-CY-TBIでは有意にgrade3以上の口内炎発症が多かった。また好中球減少期間が長いほどgrade3以上の口内炎の発症は有意に多かった。

口内炎の移植経過に与える影響 (grade3以上)

	grade 3未満 (n=77)	grade 3以上 (n=36)	
食事中止	57/77 (74.0%)	32/36 (88.9%)	p = 0.07
絶食期間	16日間 (0-55)	20日間 (0-46)	p = 0.08
高カロリー輸液	72/77 (93.5%)	32/36 (88.9%)	NS
麻薬性鎮痛薬	26/77 (33.8%)	26/36 (72.2%)	p < 0.001
FN	48/77 (62.3%)	30/36 (83.3%)	p < 0.05
発熱 (MAX)	37.9°C (36.8-40.6)	38.3°C (36.9-40.2)	p = 0.10
CRP (MAX)	3.11 (0.13-31.76)	9.9 (0.24-24.85)	p < 0.05
血液培養	11/77 (14.3%)	5/36 (13.9%)	NS
aGVHD	53/77 (68.8%)	23/36 (63.9%)	NS
aGVHD (≥ II)	31/77 (40.3%)	14/36 (38.9%)	NS
cGVHD	31/77 (40.3%)	16/36 (44.4%)	NS
CMV肺炎	8/77 (10.4%)	2/36 (5.6%)	NS

grade3以上の口内炎発症群では絶食期間が長い傾向があり、麻薬性鎮痛薬の使用は有意に多かった。またFNの発症およびCRP(Max)はgrade3以上の口内炎群で有意に高かった。

ロイコボリン含嗽・ロイコボリンレスキュー

		grade3以上の口内炎	
なし	55例 (49.6%)	25/55 (45.5%)	p < 0.001
ロイコボリン含嗽のみ	34例 (30.1%)	9/34 (26.5%)	
ロイコボリンレスキューのみ	2例 (1.8%)	1/2 (50.0%)	
ロイコボリン含嗽+レスキュー	21例 (18.6%)	1/21 (4.8%)	

ロイコボリン含嗽およびロイコボリンレスキューの使用によりgrade3以上の口内炎発症発症は有意に低下した。

ロイコボリンレスキュー	あり (n=23)	なし (n=90)	
aGVHD	15/23 (65.2%)	61/90 (67.8%)	NS
aGVHD (≥ grade II)	11/23 (47.8%)	31/90 (37.8%)	NS (p = 0.38)
cGVHD	5/23 (21.7%)	42/90 (46.7%)	p < 0.05
cGVHD (extensive)	1/23 (4.3%)	23/90 (25.6%)	p = 0.053

ロイコボリンレスキューの使用によりGVHDは増加していない。cGVHDに関してはロイコボリンレスキュー群の観察期間が短いことが影響している可能性があり今後の評価が必要である。

まとめ

- 重症口内炎(grade3以上)発症のリスクファクターとして移植前処置(VP-16+CY+TBI)、好中球減少期間(好中球<500/μl、21日以上)があげられた。
- 重症口内炎の発症により絶食期間は長期になる傾向があり、麻薬性鎮痛薬を必要とする患者は有意に増加した。
- 重症口内炎の発症により発熱性好中球減少症は有意に増加し、移植前処置から生着までの期間でのCRPの最大値も有意に高値であった。
- ロイコボリン含嗽およびロイコボリンレスキューの使用は重症口内炎予防に有用である可能性があるが、今後さらなる検討が必要である。
- 口腔ケアチームの介入により口内炎を正確に評価・治療することが可能となった。また歯科医師はもろろん歯科衛生士の介入により患者自身による口腔内のセルフケアが改善していること、管理栄養士の介入により移植経過中の経口摂取がより負担なく行われるようになっていることも重要であると考えられる。

造血幹細胞移植における患者における急性腎機能障害

がん・感染症センター都立駒込病院
血液内科 腎臓内科

森 甚一 安藤 稔 小林 武 山下卓也
大橋一輝 秋山秀樹 坂巻 壽

緒言

造血幹細胞移植(Hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)後
早期急性腎障害(Acute kidney injury, AKI)発症の長期予後へ影響については未だ明らかではない。HSCT後早期に発症したAKIと非再発死亡(Non-relapse mortality, NRM)との関係について検討を行った。

方法

- ◆ コホート研究
単施設297例
2004年8月 - 2008年12月
- ◆ 移植前処置、幹細胞ソースによって以下3群に分類した。
myeloablative allogeneic HSCT (M-allo)
non-myeloablative allogeneic HSCT (Nm-allo)
autologous HSCT (Auto)
- ◆ AKIの診断、及び重症度分類はRIFLE criteriaに従った。
- ◆ Kaplan-Meier法を用いて非再発死亡(non-relapse mortality, NRM)に関する生存分析を行った。
- ◆ Cox 回帰分析を用いてRIFLE各カテゴリのNRMに対する相対危険率を算出した。

HSCT後早期AKIの定義

HSCT前血清Cr値と
HSCT後100日以内の血清Cr値の最高値からRIFLE基準に従い診断する。

RIFLE	定義
Risk	Serum creatinine x1.5 or GFR decrease > 25% from baseline.
Injury	Serum creatinine x2.0 or GFR decrease > 50% from baseline.
Failure	Serum creatinine x3.0, GFR decrease > 75% from baseline Or serum Cr > 4mg per 100ml with an acute rise > 0.5mg per 100ml
Loss	Complete loss of kidney function > 4 weeks
End-stage kidney disease	End stage kidney disease > 3 months

結果(1)

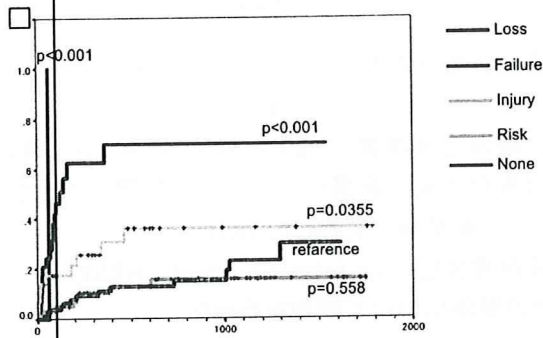
	M-allo (n=198)	Nm-allo (n=41)	Auto (n=57)
年齢	38.7±10.7	47.2±14.1	52.5±10.8
性別(男/女)	111/87	28/13	38/19
移植前血清 Cr (μg/L)	71.8±20.2*	79.8±26.0	74.4±18.9
疾患名			
ALL	46 (23.2%)	3 (7.3%)	0 (0%)
ANLL	78 (39.4%)	14 (34.1%)	5 (8.8%)
CML	18 (9.1%)	2 (4.9%)	0 (0%)
MDS	34 (17.2%)	6 (14.6%)	0 (0%)
MIM	4 (2.0%)	1 (2.4%)	39 (68.4%)
AA	3 (1.5%)	13 (31.7%)	0 (0%)
NHL	10 (5.1%)	0 (0%)	10 (17.5%)
Others	5 (2.5%)	2 (4.9%)	3 (5.3%)
幹細胞ソース			
BM	141 (71.2%)	28 (68.3%)	0 (0%)
PB	30 (15.2%)	7 (17.1%)	57 (100%)
CB	27 (13.6%)	6 (14.6%)	0 (0%)
血縁ドナー	67 (33.8%)	3 (7.3%)	—
急性GVHD			
Grade 0-1	134 (68.0%)	26 (63.4%)	—
Grade ≥2	63 (32.0%)	15 (36.6%)	—
慢性GVHD	30 (19.1%)	10 (29.4%)	—
再発	49 (24.7%)	8 (19.5%)	10 (20.8%)

結果(2)

	No. (%)		
	M-allo (n=198)	Nm-allo (n=41)	Auto (n=57)
None	78 (39.4)	17 (41.5)	49 (86.0)
Risk	61 (30.8)	10 (24.4)	7 (12.5)
Injury	29 (14.6)	9 (22.0)	1 (1.8)
Failure	29 (14.6)	4 (9.8)	0 (0)
Loss	1 (0.5)	1 (2.4)	0 (0)
End Stage	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Any Stage	120 (60.6)	24 (58.5)	8 (14.1)

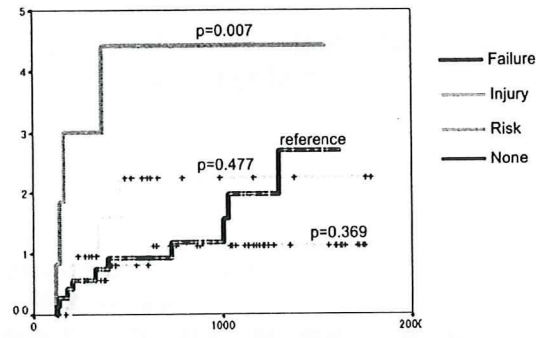
結果 (3)

day100 Non-relapse mortality M-allo



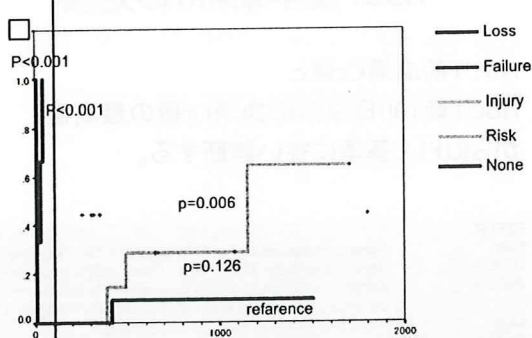
結果 (3)

Non-relapse mortality M-allo 100日以内死亡例を除く



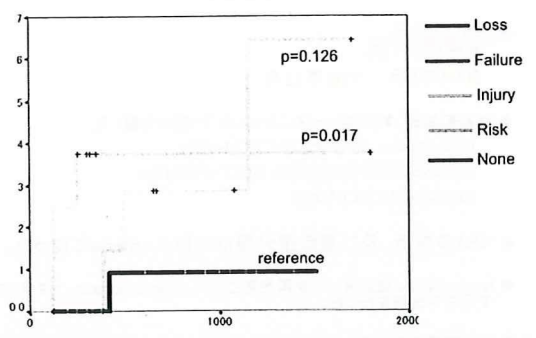
結果 (3)

day100 Non-relapse mortality Nm-allo



結果 (3)

Non-relapse mortality Nm-allo 100日以内死亡例を除く



結果 (4)

100日以内死亡例を除く

	M-allo		Nm-allo	
	Hazard Ratio*	P-value	Hazard Ratio*	P-value
Failure	7.727 (2.088-28.593)	0.002		
Injury	1.786 (0.543-5.875)	0.340	17.997 (1.046-309.765)	0.047
Risk	0.601 (0.203-1.779)	0.358	0.267 (0.267-44.9)	3.42
None (reference)	1		1	

* 移植時年齢、性別、幹細胞ソースで調整

結語

Allo-HSCT後早期AKIは重症度が高い場合
100日以上生存すれば、
その後のNRMに対する影響がある。

リハビリテーションと移植後のQOL

石川愛子¹⁾²⁾ 森毅彦³⁾ 近藤咲子⁴⁾ 岡本真一郎³⁾

- 1) 慶應義塾大学大学院 医学研究科
- 2) 慶應義塾大学リハビリテーション科
- 3) 慶應義塾大学 血液内科
- 4) 慶應義塾大学病院 看護部

自社のロゴ

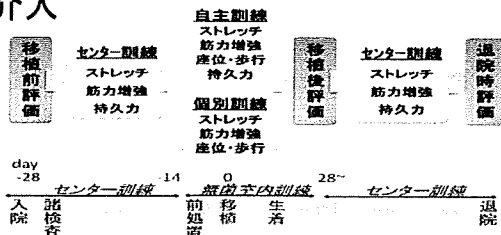
目的

- 同種造血幹細胞移植では、治療侵襲が大きく入院が長期となり、致命的合併症も多い。
- そのため、治療期間中のフィジカルフィットネス低下のリスクはより高く、フィットネス低下に伴うADL低下を予防することで、患者のQOLを維持・向上させられると推察される。
- 今回我々は、移植前後を通じてリハビリテーション(以下リハ)訓練(理学療法)を施行している患者を対象に、持久力変化を中心に評価、検討した。

対象

- 当院にて、評価期間中に同種造血幹細胞移植を受けた成人患者のうち、移植前後に複数回運動負荷試験を実施できた者。(詳細は後述)

介入



評価

- 評価時期
 - 1) 移植前処置前(以下:移植前)
 - 2) 移植後センターリハ再開時(以下:再開時)
 - 3) 退院時
 - FACT-BMTについては移植前に代わり移植直後
- 尺度
 - 最高酸素摂取量(Peak VO₂) : エルゴメーターランプ負荷(10~15W/min)
 - 膝伸展筋力(三菱 Strength Ergo[®])
 - 握力, 体重, 血液検査所見
 - FACT-BMT スコア



1. 移植前と再開時の比較

対象

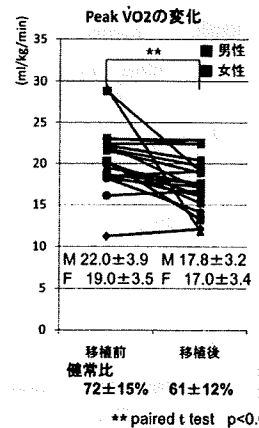
- 当院にて、2008年3月~2009年3月に同種造血幹細胞移植を受けた成人患者29名中、移植前後に運動負荷試験を実施できた20名。(男性11名、女性9名、年齢40.9±11.8歳)

急性骨髄性白血病	3
急性リンパ性白血病	2
慢性骨髄性白血病	1
骨髄異形成症候群	2
ホジキンリンパ腫	1
非ホジキンリンパ腫	4

多発性骨髄腫	4
骨髄線維症	2
重症再生不良性貧血	1

結果

- 初回評価から再評価まで
 - 62.5±14.0日
- Peak時の平均呼吸商
 - 前後ともに R>1.2
- 移植前後比 (post/pre)
 - Peak VO₂ : 87±16%



PEAK VO₂変化への各因子の寄与

R ² (決定係数)	調整済みR ²	推定値 標準誤差	分散分析 F値	分散分析 有意確率
0.390	0.354	0.81630141	10.875	0.004
投入変数 (F<0.050)	標準化 係数β	t	有意 確率	標準 偏差
Hb変化	0.625	3.298	0.004	0.187
除外変数 (F>=0.100)	投入時 標準化係数β	t	有意 確率	偏相関
Alb変化	0.079	0.393	0.699	0.098
体重変化	-0.122	-0.623	0.542	-0.154
膝伸筋筋力変化	0.210	1.118	0.280	0.269
握力変化	0.290	1.513	0.147	0.356
FACT-BMT平均	-0.198	-1.030	0.318	-0.249
年齢	-0.068	-0.339	0.739	-0.005
性別	0.203	1.077	0.297	0.260

重回帰分析(ステップワイズ法:従属変数はPeak VO₂変化)

2. 移植前、再開時、退院時の比較

対象

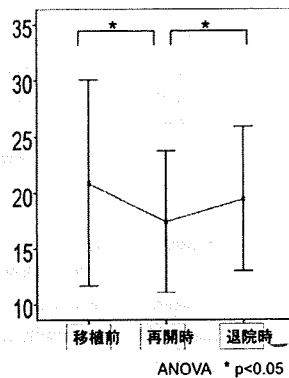
○ 当院にて、2008年3月～2009年5月に同種造血幹細胞移植を受けた成人患者35名中、上記の3回とも運動負荷試験、握力、筋力評価の全てを実施できた15名。
(男性9名、女性6名、年齢44.9±8.8歳)

急性骨髄性白血病	0	多発性骨髄腫	4
急性リンパ性白血病	3	骨髄線維症	2
慢性骨髄性白血病	1	成人T細胞白血病	1
骨髄異形成症候群	2		
ホジキンリンパ腫	0		
非ホジキンリンパ腫	2		

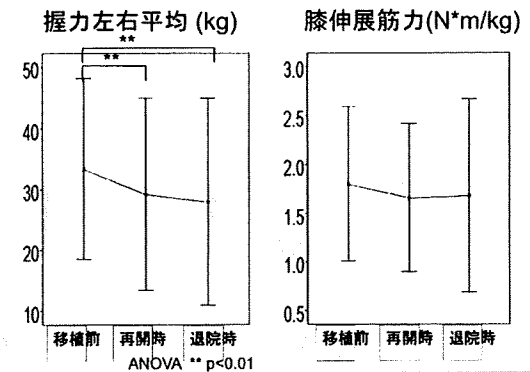
結果 : グラフはMEAN±2SD

- 移植前-退院時
103.6±19.1日
- 退院時評価
day 83.6±16.3
- 1) Peak VO₂、2) 握力、3) 膝伸筋筋力、4) Hb値、5) 体重、の各々の変数間に有意な関連性は見せず。
- FACT-BMTは遅れて2009.1より評価を開始したため、今回は別に述べる。

Peak VO₂ (ml/kg/min)

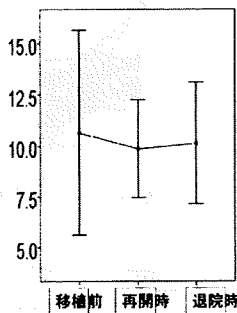


結果 : グラフはMEAN±2SD

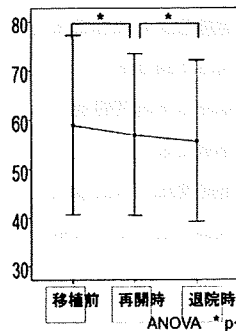


結果 : グラフはMEAN±2SD

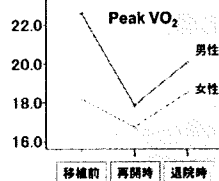
Hb値 (g/dl)



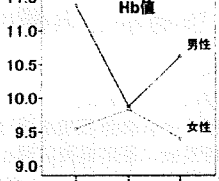
体重 (kg)



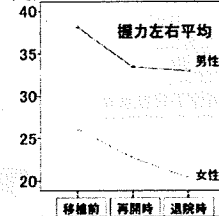
Peak VO₂



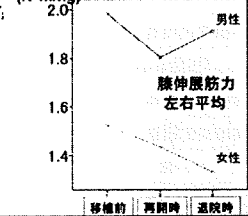
Hb値



握力左右平均

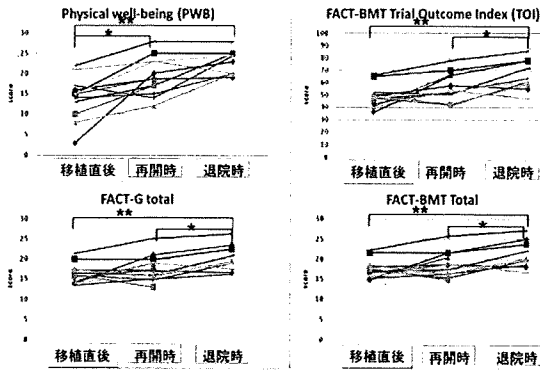


膝伸筋筋力左右平均



3. FACT-BMTの推移 (N=9)

ANOVA * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$



考察と課題

- 治療侵襲にも関わらず、再開時や退院時に持久力や筋力がほとんど低下しない症例もあり、リハ効果が示唆された。
- 膝伸展筋力の低下率が握力と比較して少なかった。当院では転倒予防や活動性向上のため、下肢を中心とした筋力増強訓練に重きを置いており、その効果が示唆された。
- 移植前、再開時の2点比較ではHb値変化率が持久力変化に影響するという結果を得た。臨床的にもHb値の推移が持久力に影響している印象はあるが、3点比較では関与が有意でなかった。今回は症例数が少ないため今後の検討において注目したい。
- フィジカルフィットネスの維持向上は患者のQOLを高めると言われているが、同種移植において、その多面的な構造分析の報告はまだ限られる。フィットネス変化に影響する因子として、さらに疾患、移植前処置、移植後合併症等も考えられ、今後症例数を増やして、さらに詳細な検討を要する。

新しい AML 腫瘍マーカーの開発

国立感染症研究所

浜口 功

急性骨髄性白血病(AML)は、年間約 7000 人が死亡する原因となる重篤な疾患である。近年、AML を含む白血病のマーカーとして WT1 mRNA 値を定量 PCR で測定できるようになった。しかしながら WT1 は細胞内因子であり測定には末梢血に白血病細胞があることが前提となっているため、極早期の測定などには困難である場合が考えられる。そこで、我々は、新規に AML に特異的に発現する分泌型の腫瘍マーカーを探索し、AML の患者血清などを用いた診断法を開発することを目的として研究を行った。

我々は、造血幹細胞や生殖幹細胞で共通して特異的に発現する遺伝子の解析を行った中で HE4 が血液細胞の中でも造血幹細胞集団に特異的に発現することを発見した(unpublished data)。近年、造血幹細胞や癌幹細胞は、共通したメカニズムで細胞増殖や自己複製を行っていること知られるようになり、HE4 も血液腫瘍細胞で高発現する可能性が考えられた。そこで HE4 が AML で特異的に発現するか AML 患者の骨髄細胞や末梢血から抽出した RNA で HE4 mRNA 発現量を定量 PCR で測定した。その結果、AML 細胞で HE4 が高発現することが明らかとなった。

HE4 は、WAP-Type four disulfide core (WFDC) domain と呼ばれる構造を 2 つ持ち、同様の構造を持つタンパク質にプロテアーゼ阻害活性があることが知られることから、その機能としてプロテアーゼ阻害作用があることが予想されている。また近年、卵巣がんマーカーとして、特に早期の卵巣がんの優れた腫瘍マーカーとして、EIA 測定キットが作製されている。

今回 HE4 EIA 測定キットを用いて AML 患者 3 例の末梢血の血漿の HE4 タンパク質発現量を測定したところ、健常人血漿の HE4 値に比べ高値を示した。HE4 が AML 患者血清・血漿中に高発現している分泌タンパク質である可能性が考えられ、AML 腫瘍マーカーとして診断に有用である可能性がある。症例を増やし検討を行う予定である。

抑制性補助シグナル分子GITRLによる 抗白血病免疫制御のメカニズム —GVL効果の増強にむけて—

金沢大学大学院医学系研究科細胞移植学
近藤 恭夫, 中尾 真二

腫瘍細胞が患者の抗腫瘍免疫から エスケープするメカニズム

Cancer immunoeediting (3Es)

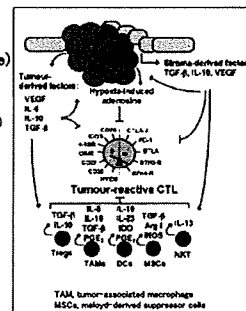
1. Elimination phase (cancer immunosurveillance)
2. Equilibrium phase (cancer persistence)
3. Escape phase (cancer progression)

(Dunn GP, et al. Nat Rev Immunol. 2006)

エスケープのメカニズム

• Immune exhaustion (腫瘍関連抗原 (TAAs) を過剰発現している腫瘍細胞による機能的結合性が高いTAAs特異的CTLsのクローン除去など)

• Inhibition (腫瘍細胞上に発現している抑制性補助刺激分子など)



(Stagg J, et al. Immunol Rev. 2007)

GITR

(Glucocorticoid-induced TNFR-related protein)

- TNF receptor superfamilyに属し、活性化T細胞, CD4⁺CD25⁺ 調節性T細胞, NK細胞が発現している。
- ヒトNK細胞では、固形癌が過剰発現しているGITRLリガンド (GITRL)との結合によって、固形癌に対するNK細胞の細胞傷害活性が低下する。
- GITR/GITRL結合によって両方向性にシグナルが伝達される。
- マウス形質細胞様樹状細胞(pDC)上のGITRLがGITRと結合すると、pDC内でトリプトファン代謝酵素Indoleamine 2, 3-dioxygenase(IDO)活性が高まり、pDCの抗原提示能が低下する (Grohmann U, et al. Nat Med, 2007)。

これまでの研究のまとめ ①

- 一部の骨髄性白血病患者では、白血病細胞上にGITRLが高発現している。
- 一部の骨髄性白血病患者の末梢血中には、白血病細胞由来骨髄系樹状細胞(mDC)が検出される。
- 白血病細胞由来mDCをTNF- α 存在下で成熟させると、GITRLの発現が亢進する。
- 白血病細胞由来mDCを抗原提示細胞として、HLA一致健常ドナー由来CD8⁺T細胞の中からTAAsであるcyclin dependent kinase (CDK) 2特異的CTLを誘導する際に、抗体によってGITR/GITRL結合を阻害するとCTLの誘導効率上昇する。

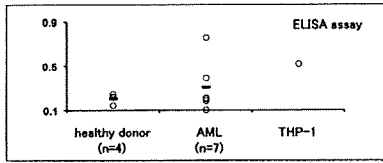
これまでの研究のまとめ ②

- 白血病細胞上のGITRLとGITRが結合することによって白血病細胞内でIDO活性が高まり、白血病細胞内で生成された tryptophan代謝産物kynurenineが細胞外に分泌される。
- IDOの活性化によって生成されるkynurenineは、汎T細胞, CD4⁺T細胞, CD8⁺T細胞の増殖を抑制する。

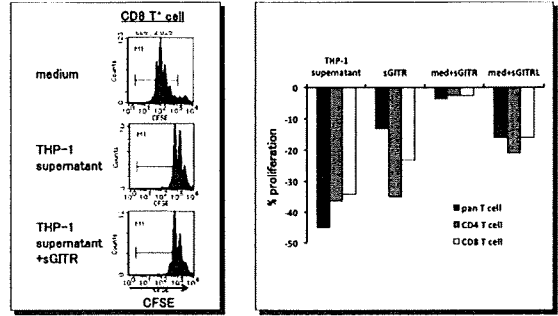
目的

- 白血病細胞由来の可溶性GITRL (sGITRL)がT細胞上のGITRとの結合によって直接的にT細胞の活性化を抑制し、白血病細胞を患者の抗白血病免疫からエスケープさせ得るか否かを明らかにする。

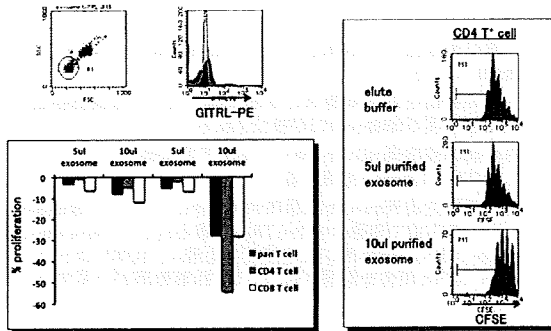
患者血清中および単球性白血病細胞株THP-1細胞培養上清中のsGITRLの検出



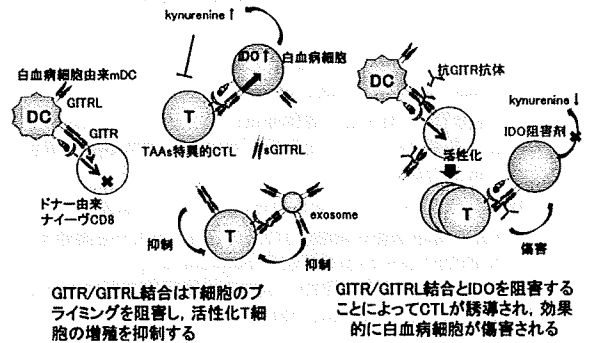
THP-1細胞上清中のsGITRLはT細胞の増殖を抑制する



THP-1細胞上清中に検出されるGITRL陽性exosomeによってT細胞増殖が抑制される



GITR/GITRL結合、IDO活性阻害によるTAA特異的CTLsを介したGvL効果の増強



まとめ

- 一部の骨髄性白血病細胞患者では血清中にsGITRLが検出される。
- 単球性白血病細胞株THP-1の培養上清中にはsGITRLとGITRL陽性exosomeが検出される。
- sGITRLならびに白血病細胞由来のGITRL陽性exosomeは、汎T細胞、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞の増殖を抑制する。

考察

- 白血病細胞由来mDCsが発現しているGITRLはTAA特異的CTLsのプライミングを阻害し、白血病細胞が発現しているGITRLはGITRLとの結合によって白血病細胞内でIDO活性を高め、その結果kynurenine分泌を介してTAA特異的CTLsの活性を抑制するのみならず、患者血清中の白血病細胞由来sGITRLはCTLsの活性を直接的に抑制している可能性が示唆された。
- Allo-SCT後にCDK2ペプチドをワクチンとして投与する際、同時に抗GITRL抗体とIDO阻害剤を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。

HLA半合致ミニ移植における、ゼットプリン 2mg/kg * 4days と、サイモグロブリン 1mg/kg * 4days (or *3days) の、リンパ球分画回復の比較

兵庫医科大学 血液内科

池亀和博、吉原哲、小川啓恭

背景と目的

本研究として行っている血縁HLA半合致移植(haplo-mini)では、ATGとしてゼットプリン(ATG_F)を用いている。しかしその研究期間中にサイモグロブリン(THY)が、移植前処置として保険適応を受けた。

我々は両抗体の変換比を2:1と仮定し、従来ATG_F 2mg/kg/day * 4daysで行っていたところを、THY 1mg/kg/day * 4daysに変更して用いた。

この変換比が、造血幹細胞移植領域において適正かどうか、移植後の各リンパ球分画の回復で比較した。

方法

後ろ向き(カルテベース)症例対照研究

対象

2006年6月から2009年10月までに、兵庫医大血液内科で行った血縁HLA半合致ミニ移植(haplo-mini)で、移植後8週(day 56)までに、1週間以上の間隔で少なくとも2回以上リンパ球分画(CD3, CD4, CD8, CD19, CD56)を測定している症例とした。56日以内の早期死亡例は除いた。
2008年11月まではゼットプリンATG_Fを用い、当院で保険診療として処方できるようになった2008年12月以降は、サイモグロブリンTHYを用いた。2008年12月以降でも、班会議登録症例はゼットプリンATG_Fを用いている。

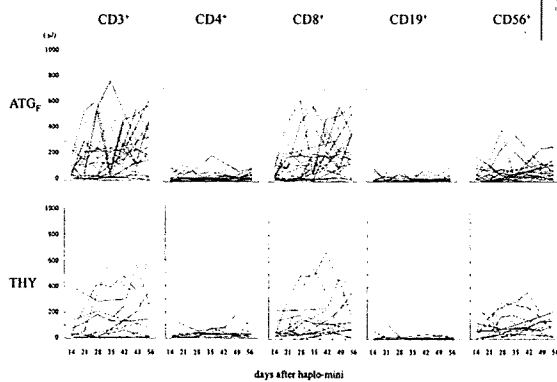
移植方法(血縁HLA半合致移植)

前処置は、FLU/BU/ATG又は、FLU/MEL/ATGを主体とし、腫瘍量減量が必要な場合は、適宜high dose AraCを加えた。
GVHD予防は、tacrolimus (target conc. 10-12ng/ml) + mPSL 1mg/kg/dayを基本とし、50歳以上の症例ではMMF 15mg/kg/dayを加えた。
THY群22例中、最近の7例では、THY 1mg/kg/day * 4daysでは多いという印象から、THY 1mg/kg/day * 3daysに減量している。ただし最終投与日はDay -1に揃えている。

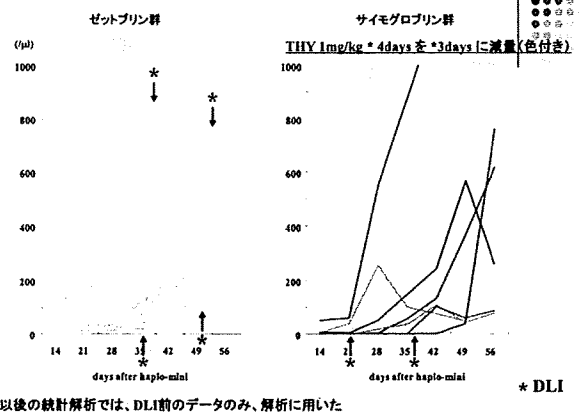
Patient's characteristics

	ゼットプリン群 (n=37)		サイモグロブリン群 (n=22)	
	ATG _F		THY	
年齢	20-63 (50)		17-62 (50)	
性別 (M/F)	19/18		16/6	
疾患 (AML/ALL/lymphoma/others)	25/17/4		8/9/4	
(post-alloSCT relapse)	12 (32%)		13 (59%)	
GVHD予防	TAC+mPSL(1)	30	TAC+mPSL(1)	17
	TAC+mPSL(1)+MMF	7	TAC+mPSL(1)+MMF	5
ドナー (offspring/sibling/parent/cousin/aunt)	27/7/0/3/0		11/5/2/3/1	

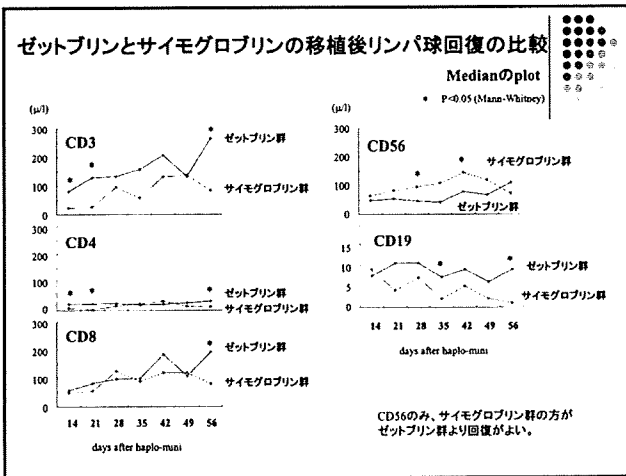
移植後リンパ球回復のraw data



移植後CD3+回復



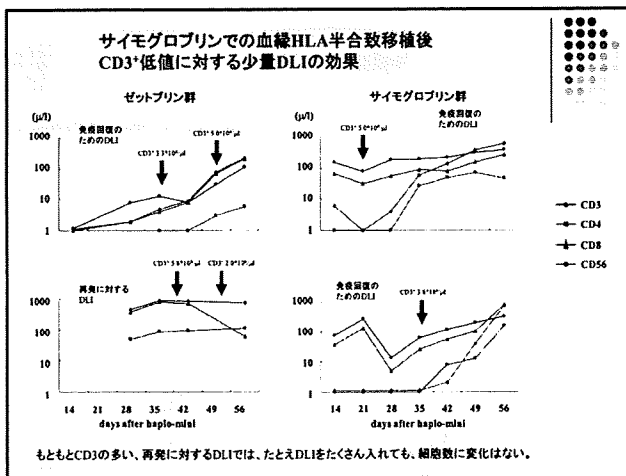
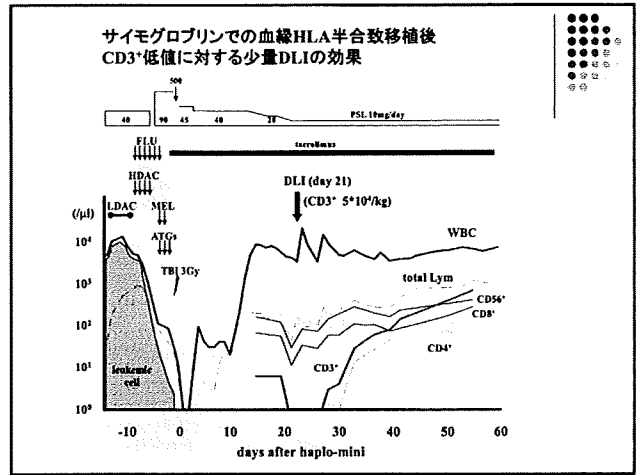
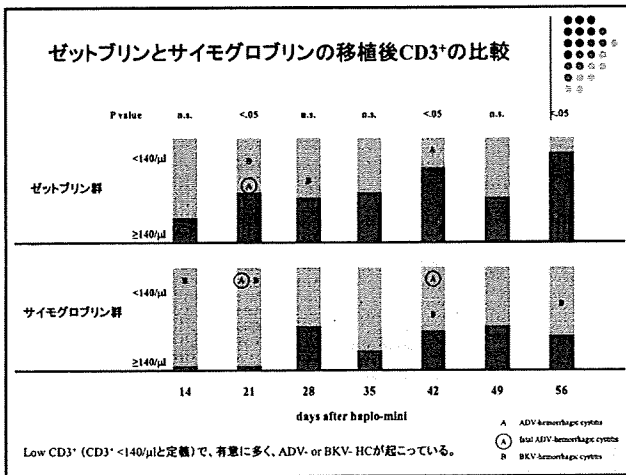
以後の統計解析では、DLI前のデータのみ、解析に用いた



免疫不全の閾値を越えるかどうかの人数での比較

生物学的(リンパ球と抗体の反応)には、細胞の絶対数の順位和で検定したが、臨床的には、細胞数がある閾値より少ない症例が特に問題となる。

ウイルス(ADV, BKV)性膀胱炎の発症率を参考に、その閾値を $CD3^+ < 140/\mu l$ と定義して、閾値を越えている患者と、それより少ない患者の割合をみた。



ウイルス感染エピソード

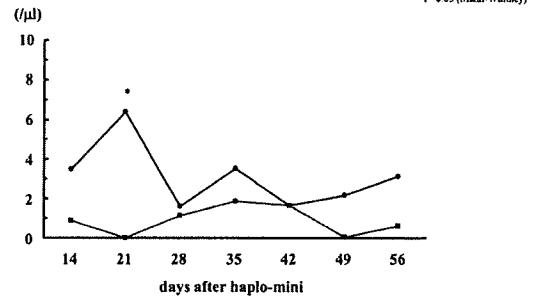
	ゼットプリン群 (n=37)	サイモグロブリン群 (n=22)	
CMV antigenemia	34/37	22/22	n.s.
CMV pneumonitis	0/37	0/22	n.s.
BKV hemorrhagic cystitis	4/37	6/22	n.s.
ADV hemorrhagic cystitis	4/37	3/22	n.s.
fatal systemic ADV infection	1/37	2/22	n.s.

再発エピソード

ゼットプリン群 (n=37) サイモグロブリン群 (n=22)

Day 100以内の 原病の再発	20/37	7/22	n.s.
---------------------	-------	------	------

ゼットプリンとサイモグロブリンの移植後foxp3⁺の比較



結論

サイモグロブリン群では、ゼットプリン群と比較して、移植後 day 21でのCD3⁺、CD4⁺、CD8⁺の回復が遅れる。特にCD3⁺ではday 56でも回復が遅れている。CD56⁺は、むしろサイモグロブリン群で多くなる。

CD3⁺が少ない(<140/ml)ときに、ADV- BKV- HCを起こしやすいが、ウイルス感染症全体での発生頻度、重症度は、サイモグロブリン群とゼットプリン群とで差はない。

両群ともに、再発には影響しない。

免疫抑制剤onの状態での少量DLIは、2週間程度でCD3⁺の回復をもたらす。

Foxp3の絶対数では、CD3⁺、CD4⁺と同様にサイモグロブリン群で少ない傾向がある。

低用量ATGを移植前処置に用いた NIMA相補的血縁者間移植

一戸 辰夫
京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科

低用量ATGをGVHD予防に用いた NIMA相補的血縁者間造血幹細胞移植

●NIMA移植の前処置へのrATGの導入

1. アロ応答性エフェクターT細胞のin vivo depletion
2. NIMA応答性制御性T細胞の増幅?

急性GVHD、慢性GVHD(特に重篤な肺障害)の発症抑制効果を期待可能。

RATIONALE

- Data obtained from murine models and humans have suggested that the detection of long-term fetal-maternal microchimerism in peripheral blood may be an indicator of immunologic hyporesponsiveness to non-inherited maternal HLA antigens (NIMA) or inherited paternal antigens (IPA).
- Although transplanted immune cells from an HLA-mismatched donor frequently cause severe graft-versus-host disease, selection of a microchimeric related donor with the help of in vivo partial T-cell depletion may prevent this from happening.

PURPOSE

- This trial is studying the adverse events and survival after T-cell-replete hematopoietic stem cell transplantation with the use of a fixed dose ATG-containing myeloablative or reduced-intensity conditioning regimen from a NIMA- or IPA-mismatched related donor who is shown to have long-term fetal-maternal microchimerism.

DESIGN

- SE (safety & efficacy) trials using a fixed dosage of conditioning agents.
- No parallel treatment groups.
- Safety is evaluated by the incidence of grade III or IV acute GVHD and non-relapse mortality as primary endpoint.
- Efficacy is determined by 1-yr overall survival.

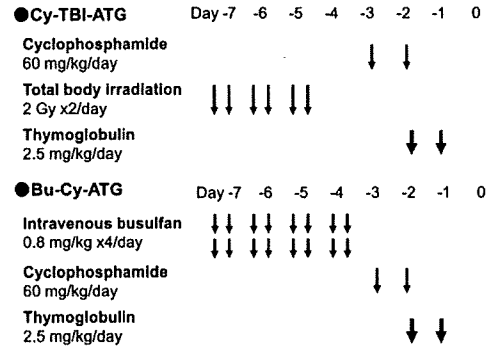
PATIENT ELIGIBILITY

- Ages: 18 years to 55 years.
- Disease: Hematologic malignancies refractory to conventional therapy.
- Lack of HLA-matched related donor
- Lack of immediate access to an HLA class I-compatible or single allele-mismatched unrelated marrow donor.
- Unavailability of an unrelated cord blood unit containing nucleated cell doses of $2.0 \times 10^7/\text{kg}$ or more at the time of freezing (to be discussed).

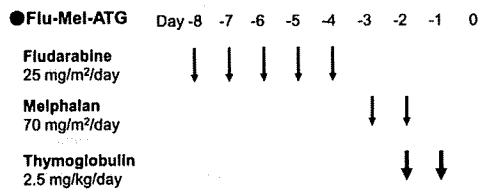
DONOR CRITERIA

- Ages: 18 years to 55 years.
- HLA disparity: Accept one or more mismatches at HLA-A, -B, -DR antigens (serologic level) in the GVH direction based on the result of 4-digit typing of HLA-A, -B, -C, -DRB1.
- Fetal or maternal microchimeric cells that express mismatched recipient HLA antigens should be detected in peripheral blood.
- Use of T-cell-replete bone marrow is preferred.

CONDITIONING (Myeloablative)



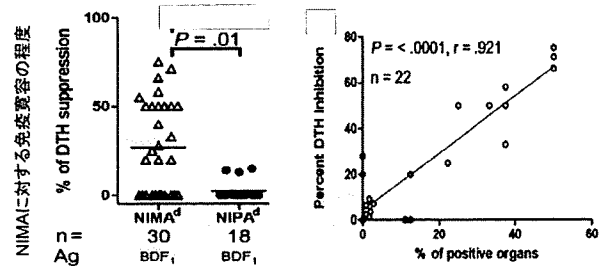
CONDITIONING (Reduced-intensity)



GVHD PROPHYLAXIS

Tacrolimus : Day -1~
Mini-dose methotrexate : Days +1, +3, +6

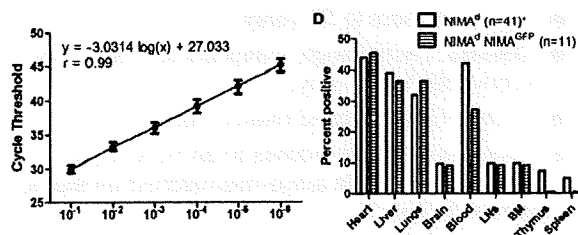
Microchimerism is positively correlated with acquired tolerance to NIMA in mice



NIMAに対する免疫寛容は、maternal microchimerismが検出される臓器の割合に比例する(8または9臓器で検討).

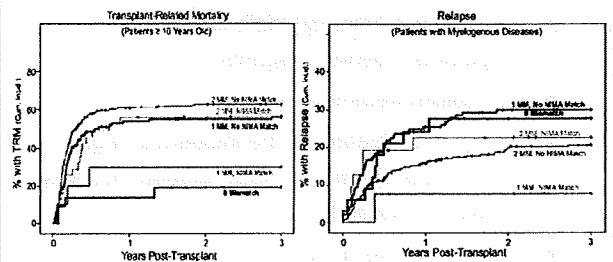
Dutta et al. *Blood*. 2009;114:3578.

Quantitative PCR detection of maternal microchimerism and its tissue distribution



Dutta et al. *Blood*. 2009;114:3578.

Reexposure of cord blood to NIMA confers less TRM and relapse after UCBT



van Rood et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:19952.