

臍帯血移植における感染症の発症は移植成績に大きく影響するが、特にウイルス感染症は細胞性免疫の回復と共に当初から懸念されていた。一方で、小児を対象としたミネソタ大からの報告では、移植後早期(42日以前)あるいは後期(半年から2年)のいずれの期間においても非血縁骨髄移植での発症率と比較し、差はないことが明らかになっている<sup>1</sup>。

同じミネソタ大のグループは、成人を中心とした臍帯血移植患者においてサイトメガロウイルス(CMV)既感染患者での移植後100日までの移植関連死亡率が未感染者に比べて高い傾向にある( $P=0.07$ )が生存率など他の臨床結果には影響を与えなかったとしている<sup>2</sup>。一方で既感染患者におけるCMV感染症の発症率は14%であり、同発症者は非発症者に比べて有意に移植関連死亡率が高く、全生存率が低いことを明らかにしている。

医科研では生着後から退院までの約3~4ヶ月間、2回/週の頻度でCMV抗原血症をC10/C11法で測定し、陽性の場合にはpreemptive therapyとしてガンシクロビル5mg/kgを投与している。そこで、入院中にCMV再活性化(抗原血症陽性)が10回以上認められた群を高頻度陽性群、それ未満の場合は陰性・低頻度陽性群と定義し、臨床経過についての比較を行った。対象は1998年8月~2009年7月に初回臍帯血移植を標準的前処置を用いて行った成人患者152名である。HLA適合度は、2抗原不一致が92例、1抗原不一致53例、抗原一致7例であった。解析結果、高頻度陽性群の割合は、抗原一致で14%(1/7)、1抗原不一致で13%(7/53)、2抗原不一致で22%(20/92)であり、HLA適合度による影響は認めなかった。好中球および血小板回復についてみると、高頻度陽性群で造血回復が不良である傾向がみられた。また、グレードIIIあるいはIV度の急性GVHDおよび全身型慢性GVHDの発症率は、それぞれ高頻度陽性群で29%と65%、陰性・低頻度陽性群で9%と26%と、単変量解析では有意に高頻度陽性群で高かった。3年生存率は、高頻度陽性群で61%、陰性・低頻度陽性群で73%であったが群間に有意な差は認めなかった。入院期間について解析を行ってみると、陰性・低頻度陽性群105日に比べて高頻度陽性群では中央期間は161.5日と有意に長期にわたっており、この入院期間の長期化は多変量解析でも有意であった( $P=0.037$ )。

HLAの一致度の程度が移植後のCMVの再活性化に影響を及ぼさないことは、我々が前回報告した移植後の抗原特異的な細胞性免疫再構築に影響を与えなかったことも矛盾せず、更には米国からの報告<sup>2</sup>と同様の結果であると考えることができる。以上より、CMV再活性化は生命予後に明らかな影響は与えないものの、臍帯血移植後患者のQOLからみて、その抑制は重要な意味を持つと考えられる。

#### 参考文献

1. Barker JN, Hough RE, van Burik J-AH, et al. Serious Infections after Unrelated Donor Transplantation in 136 Children: Impact of Stem Cell Source. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2005;11:362-370.
2. Beck JC, Wagner JE, DeFor TE, et al. Impact of Cytomegalovirus (CMV) Reactivation after Umbilical Cord Blood Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2010;16:215-222.

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）  
研究分担報告書  
成人長期生存症例のQOLに関わる因子の抽出とその対策に関する研究

「同種造血幹細胞移植後長期生存例における慢性腎臓病  
—発生率、有病率、関連因子—

研究分担者 下井辰徳 秋山秀樹 都立駒込病院 血液内科

研究要旨

造血幹細胞移植後10年目での慢性腎臓病の有病率は33%であり、移植後AKIは5年目CKDに有意に関連した。

A. 研究目的

慢性腎臓病（CKD）は同種造血幹細胞移植（HCT）後長期生存者の合併症であるが、その発生率と有病率の推移を長期間経時的に解析した。

B. 研究方法

1990～1999年に当科でHCTを施行され10年以上生存した77例のデータベースを後方視的に解析した。CKDはeGFR<60ml/min/1.73m<sup>2</sup>が3カ月以上持続することと定義し、HCT後急性腎傷害（AKI）は、HCT後100日までの血清Cr値の変化に基づいたAKI-Networkの診断基準により3つのstageに分類した。累積CKD発症率をKaplan-Meier法で、「HCT後5年または10年時点でCKDである」ことに対する関連因子を多変量logistic回帰分析により解析した。（倫理面への配慮）

施設倫理委員会による承認を得、かつ個人情報管理には十分留意した。

C. 研究結果

対象患者の背景を表1に、移植後の結果を示す。新規CKD発症率はHCT後1年目が10%で最も高く、以後は毎年約2%で一定であった。したがって、CKD有病率は観察年数に伴い漸増した（移植5年目22%、10年目33%）。5年目CKDの関連因子は前処置放射線照射（TBI/TLI）（OR, 12）、AKI（OR, 11）、

移植時年齢（OR, 1.1）、10年目CKDのそれは移植時年齢（OR, 1.1）、TBI/TLI（OR, 22）、慢性GVHD（OR, 5.4）であった。

D. 考察

10年目CKD有病率（33%）は欧米の既報（4.5-10%）に比べ高かったが、後者は継時的な解析による結果ではない。移植後AKIは5年目CKDの関連因子であるが、10年目CKDの因子ではなかったことは、AKIのCKDに対する影響は移植後早期に強く関わるが、長期の経過で減弱していくことを示唆する。

E. 結論

HCT後CKDの有病率は経年的に増加し5年目で22%、10年目で33%である。移植後AKIは5年目CKDのみに有意に関連するが、移植時年齢とTBI/TLIは両CKDに共通した関連因子である。

F. 健康危険情報  
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表  
52<sup>nd</sup> ASH Annual Meeting and Exposition

H. 知的財産権の出願、登録状況  
特になし。

## 同種造血幹細胞移植における患者家族の心理状態、Quality of Life、介護負担感に関する調査

慶應義塾大学医学部 精神・神経科 竹内麻理

慶應義塾大学医学部 血液内科 森毅彦

慶應義塾大学医学部 血液内科 加藤淳

慶應義塾大学病院 看護部 近藤咲子

慶應義塾大学医学部 血液内科 岡本真一郎

### <目的>

がん患者には高頻度に不安やうつ状態が見られるが、がん患者の家族も介護者であると同時に、患者同様ケアが必要な心理状態にあることが多いと言われている。特に、造血器腫瘍に対する同種造血幹細胞移植においては、大量化学療法や放射線照射による臓器傷害、その後に発症する移植片対宿主病 (GVHD) や感染症など合併症に対するケアが不可欠であり、長期的経過や家族背景を視野に入れた治療体制が極めて重要である。そこで、患者の家族が抱える心理的問題・介護負担感・生活の質を調査し、支援の構築、ニーズを探ることを目的として本研究を計画した。

### <方法>

慶應義塾大学病院で同種造血幹細胞移植を受けた患者の家族に対し、質問票を用いて、心理的問題・介護負担感・生活の質の各側面から評価を行った。心理状態は日本語版 Profiles of Mood States (POMS)、生活の質は MOS Short-Form 36-Item Health Survey (SF-36)、介護負担感については Caregiver Reaction Assessment (CRA-J) によって評価した。患者の年齢、疾患名などの基礎データは、研究分担者が診療録より情報を得た。

### <対象>

2003年1月～2009年12月に同種造血幹細胞移植を受けた患者が、介護者としてキーパーソンとして挙げた家族のうち、以下の適格条件および除外基準を満たすものを対象とした。

#### 適格条件

- ① 2003年1月～2009年12月に慶應義塾大学病院において造血幹細胞移植を行った患者の家族
- ② 患者が key person として挙げた家族
- ③ 年齢 20 歳以上
- ④ 文書による同意が得られた者

#### 除外基準

- ① 日本語の書字、読字、会話が不可能な者
- ② 移植後にいかなる原因であれ死亡した患者の家族
- ③ 主治医が不相当と判断した患者の家族

### <結果>

#### 患者背景

対象期間に慶應義塾大学病院で同種造血幹細胞移植を施行された患者は 158 人であった。そのうち選定基準に基づき対象となった患者は 98 人であった。住所不明の 11 人、患者あるいは家族から同意が得られなかった 21 人が脱落したため、調査は 66 人 (男性 29 人、女性 37 人) に行った。移植時

の平均年齢は 43.5 歳、移植から調査までの平均期間は 49.9 ヶ月であった。疾患内訳は急性骨髄性白血病 15 人、急性リンパ性白血病 9 人、慢性骨髄性白血病 1 人、慢性リンパ性白血病 1 人、骨髄異形成症候群 14 人、多発性骨髄腫 7 人、悪性リンパ腫 12 人、骨髄線維症 4 人、再生不良性貧血 1 人、成人 T 細胞白血病 1 人、顆粒球性肉腫 1 人だった。調査期間までに再発を認めた者は 5 人であった。

#### 家族背景

回答を得られた家族は、男性 35 人、女性 29 人、不明 2 人で、平均年齢は 54.5 歳であった。患者との関係は配偶者 47 人（夫 30 人、妻 17 人）、両親 14 人（父親 5 人、母親 9 人）、子供 2 人、姉 1 人、不明 2 人であった。職業は、フルタイム 27 人、パートタイム 8 人、専業主婦 15 人、無職 9 人、学生 2 人、その他 5 人だった。

#### POMS の結果

POMS の各尺度について、基準となる一般人口の標準値と比較すると、標準値以下（平均値－1 標準偏差以下）はそれぞれ緊張－不安：6 人（9.1%）、抑うつ－落込み：9 人（13.6%）、怒り－敵意：8 人（12.1%）、活気：11 人（16.7%）、疲労：13 人（19.7%）、混乱：10 人（15.1%）であった。いずれの尺度でも標準値以下とならなかったのは 17 人（25.8%）のみで、残りの 49 人（74.2%）は少なくとも一項目以上について標準値以下を示していた。

#### SF-36 の結果

SF-36 の各尺度について標準値と比較すると、標準値以下の者は身体機能：6 人（9.1%）、日常役割機能（身体）：14 人（21.2%）、体の痛み：6 人（9.1%）、全体的健康感：3 人（4.5%）、活力：7 人（10.6%）、社会生活機能：10 人（15.1%）、日常役割機能（精神）：12 人（18.2%）、心の健康：9 人（13.6%）であった。いずれの尺度でも標準値以下とならなかった者は 39 人（59.1%）だった。

#### CRA-J の結果

CRA-J については標準値が存在しないため、3 点をカットオフ値として解析した。カットオフ値以下は、日常生活への影響：10 人（15.1%）、他の家族からのサポート：2 人（3.0%）、経済的な影響：5 人（7.6%）、健康状態への影響：10 人（15.1%）、ケアに対する受け止め：14 人（21.2%）であった。

#### <考察>

POMS の結果より、造血幹細胞移植患者の家族ではなんらかの心理的な問題を抱えている割合が高いことがわかった。また、心理的問題を抱えている家族の割合と、移植からの時間や再発の有無とは相関は見られず、今回の調査からは、再発なく移植から数年経過しても家族の心理的問題は残存する可能性が示唆された。SF-36 の結果からは、心理的問題だけでなく身体機能、社会生活機能が低下している家族も多いことがわかった。一方、CRA-J の結果からは、当院で移植を受けた患者は、比較的経済的な問題は少なく、家族間のサポート力も大きいケースが多いと考えられたが、それらの問題が少ないにも関わらず心理状態や QOL が低下している家族が多く認められることより、主治医チームと精神科医や心理士、ソーシャルワーカー等の専門職との連携を図り、介護者である家族に対しても必要なサポートを提供していく体制の構築が重要と考えられた。

## 白血病細胞上のHLAクラスI分子の発現と 移植後再発

金沢大学附属病院 血液内科  
近藤恭夫、中尾眞二

### ガン細胞におけるHLAクラスI分子発現低下の メカニズム

- (a) Total loss
- (b) Selective loss
- (c) Haplotype loss
- (d) Total down-regulation
- (e) Selective down-regulation

### 目的

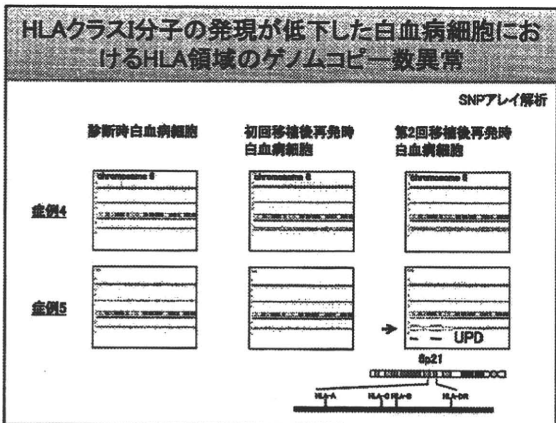
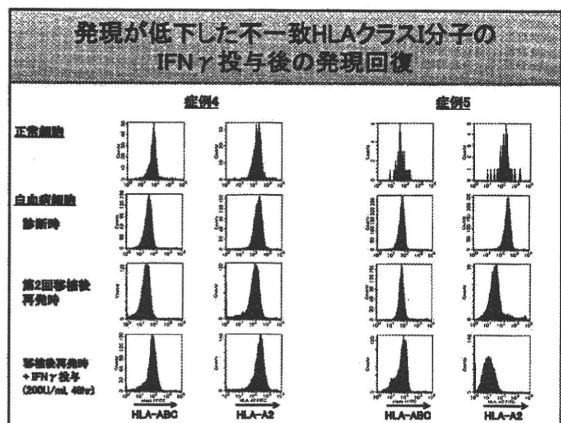
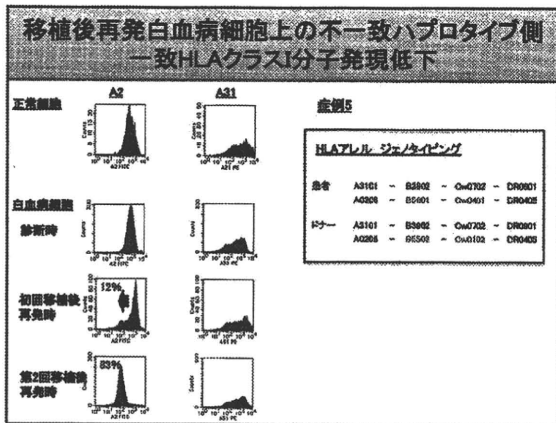
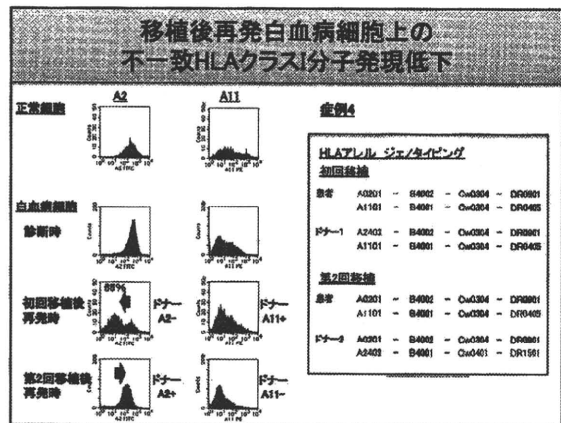
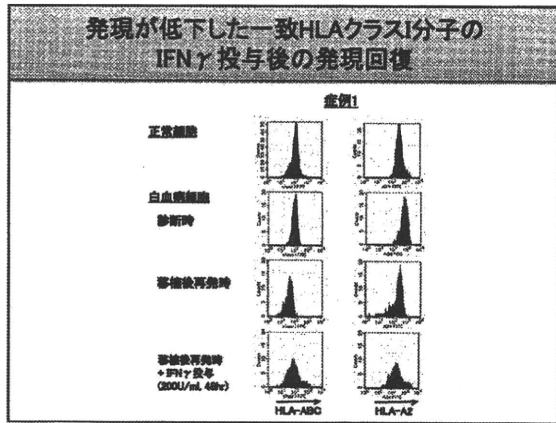
HLA不一致移植に加えてHLA一致移植後再発患者の白血病細胞についてHLA分子の発現を検討し、白血病細胞がHLAクラスI分子発現低下によってドナー由来T細胞免疫からエスケープする機序を明らかにする。

### 対象症例

症例	性別	年齢	移植前	移植後	移植後再発
1	男	37	HLA-A*01:01, B*07:02, C*07:01, E*01:01	HLA-A*01:01, B*07:02, C*07:01, E*01:01	HLA-A*01:01, B*07:02, C*07:01, E*01:01
2	男	47	HLA-A*01:01, B*07:02, C*07:01, E*01:01	HLA-A*01:01, B*07:02, C*07:01, E*01:01	HLA-A*01:01, B*07:02, C*07:01, E*01:01
3	男	47	HLA-A*01:01, B*07:02, C*07:01, E*01:01	HLA-A*01:01, B*07:02, C*07:01, E*01:01	HLA-A*01:01, B*07:02, C*07:01, E*01:01
4	男	47	HLA-A*01:01, B*07:02, C*07:01, E*01:01	HLA-A*01:01, B*07:02, C*07:01, E*01:01	HLA-A*01:01, B*07:02, C*07:01, E*01:01
5	男	47	HLA-A*01:01, B*07:02, C*07:01, E*01:01	HLA-A*01:01, B*07:02, C*07:01, E*01:01	HLA-A*01:01, B*07:02, C*07:01, E*01:01
6	男	47	HLA-A*01:01, B*07:02, C*07:01, E*01:01	HLA-A*01:01, B*07:02, C*07:01, E*01:01	HLA-A*01:01, B*07:02, C*07:01, E*01:01

### 同種造血幹細胞移植後再発と白血病細胞上のHLA クラスI分子の発現の変化

### 移植後再発白血病細胞上の 一致HLAクラスI分子発現低下



### 考察

- 移植後再発白血病細胞ではHLA不適合の有無によらずHLAクラスII分子の発現低下が高頻度に認められることが示された。
- 一致HLAクラスII分子に発現低下が認められたことから、白血病関連抗原やマイナー組織適合抗原を提示しているHLAを欠失した白血病細胞が抗原特異的ドナー由来T細胞からエスケープしていることが示唆された。
- HLAクラスII分子の発現低下のメカニズムとして、8pUPDの他HLAクラスII遺伝子の発現調節異常が示唆された。
- 移植後白血病細胞で低下したHLAクラスII分子の発現を再度誘導することによって、GvL効果を増強できる可能性が示唆された。

## 新しいAML腫瘍マーカーの開発

国立感染症研究所  
血液・安全性研究部  
浜口 功

急性骨髄性白血病(AML)は、年間7000人以上の死者を出し特に高齢者に多く発症する極めて重篤な疾患である。AMLは、発見後速やかに治療を開始することが重要であり、早期発見のための診断マーカーの開発が強く期待される。

AMLの早期の検出マーカーとして理想的には、AML細胞に特異的に高発現することに加え、血液中に放出される分泌型の因子であり、血清で簡便に測定ができる因子であることが上げられる。これらの点を踏まえると、白血病細胞特異的な分泌型のタンパク質マーカーを探索し、患者の血清を用いたタンパク質マーカーの検査法を開発することが重要であると考えられる。

これまでに我々は、生殖幹細胞や造血幹細胞などに高発現するmRNAのTranscriptome解析の中からWFDC2 mRNAが骨髄AML患者細胞で高発現することを見出した。AML患者の骨髄細胞でWFDC2の定量PCRを行った結果、正常骨髄細胞よりも極めて高い発現が認められた。WFDC2は、分泌型のセリンプロテアーゼの仲間であることが2次構造より機能予測されている。また卵巣癌細胞で高発現することが知られ、近年CA125に並ぶ優れた卵巣ガンの血清マーカーとして注目されている因子である。WFDC2がAML細胞で高発現するという報告はこれまでにない。WFDC2は骨髄AML細胞に特異的に発現し、分泌型のタンパク質因子であることからAMLの早期診断マーカーとして理想的であると考えられる。そこで、本研究ではWFDC2がAML患者の血清で優位な上昇として検出できるか検討し、HE4を用いて血清レベルでAMLの検出方法が確立できるか検討した。

パイロットスタディーとして、AML患者血清中のHE4タンパク質レベルを富士レビオHE4 EIAキットを用いて測定した。その結果、健常人の血漿のHE4値は、検出限界以下であったのに対しAML患者では高い傾向が見られた。WFDC2がAML患者の血清中に検出可能であることを確認した。現在、国立国際医療センターの検体を用いた解析の準備が整ったところであり、症例サンプルを蓄積しているところである。

今回の我々の結果は、卵巣がんマーカーとしても知られる分泌タンパク質であるHE4が、AML患者の血清でも上昇している可能性を示したものであり、AMLの診断や治療経過の観察への応用が期待できると考えられる。

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22年度第2回班会議  
 2011年1月30日 於:東京医科歯科大学湯島キャンパス

### HLA不適合血縁者間造血細胞移植における IPA/NIMA効果の再検討

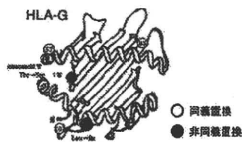
分組研究者:  
 一戸 辰夫  
 京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科

### 平成22年度の分担研究計画

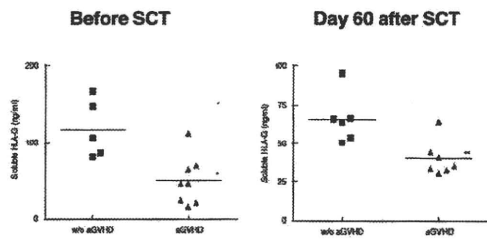
- IPA/NIMA寛容を評価するin vitro assayの開発。
  - 血清・培地を用いた可溶性HLA-Gの測定
  - PBMCを用いたHLA-G陽性細胞分画の評価
  - MLRによるHLA-G陽性細胞の検出
- 低用量ATGを前処置に用いたNIMA相補的血縁者間造血細胞移植の安全性・有効性の確認を目的とする臨床試験。
- IPA/NIMA理論に基づく新たな細胞免疫療法開発の展望

### 非古典的クラスI分子: HLA-G

- 古典的HLAクラスI分子と異なり、著しく多型性が乏しい。
- 単球上のILT4/LILRB2, T細胞・NK細胞のILT2/LILRB1と結合して、これらの細胞の機能を負に制御。
- 胎盤trophoblastに特異的に発現。母親由来の子宮NK細胞から胎児を保護する役割を有していると看做されている。
- 腫瘍細胞においてaberrantな発現が見られるとする報告あり。

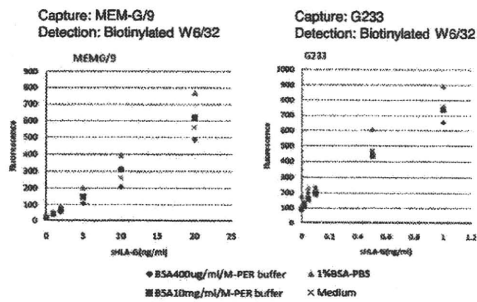


### High levels of soluble HLA-G prevent acute GVHD ?

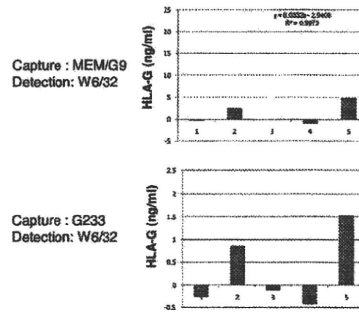


Le Maux A, Clin Exp Immunol. 2008;152:50

### ELISA assay for HLA-G

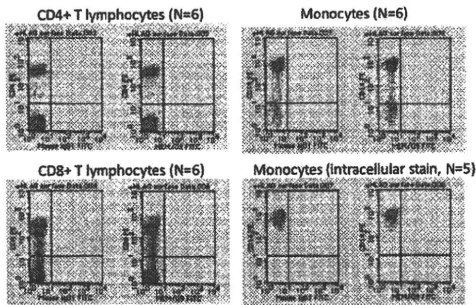


### ELISA for soluble HLA-G using sera of healthy donors





**No definitive HLA-G protein expression was detected on T-lymphocytes and monocytes from volunteer donors**



**Prediction of Reactivity to Noninherited Maternal Antigen in MHC-Mismatched, Minor Histocompatibility Antigen-Matched Stem Cell Transplantation in a Mouse Model**

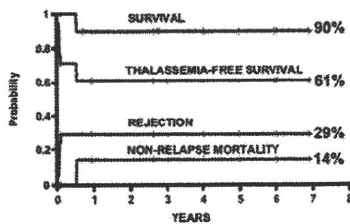
This information is current as of December 6, 2010

Mariko Araki, Masahiro Hirayama, Eiichi Azuma, Tadashi Kumamoto, Shotaro Iwamoto, Hidemi Toyoda, Mitsue Ito, Keishiro Amano and Yoshihiro Komada

*J Immunol* 2010; 185:7739-7745; Prepublished online 15 November 2010;

- Although all offspring were exposed to NIMAs, the "tolerogenic" NIMA effect was not evident.
- NIMA-exposed offspring showed two distinct reactivities against NIMA, high responder and low responder, depending on the degree of maternal microchimerism.
- These reactivities were correlated with IFN- $\gamma$ -producing cells by MLR-ELISPOT assay using pretransplant blood samples.

**T-depleted HCT from HLA-haploidentical mother confers long-term survival in children with thalassemia**



Sodani P, *Blood* 2010; 115:1296

**High doses of HLA-haploidentical maternal lymphocyte infusion can eradicate systemic EBV-positive T-cell LPD of childhood**

- As treatment for non-transplant-associated EBV(+) T-cell LPD in children, maternal PBMCs (>10<sup>8</sup>/kg/time) with microchimeric cells of the corresponding children were infused 1-4 times.
- Symptoms of all 5 children improved; thereafter, 3 cases attained complete remission for 6-18 months without any further treatment.
- No children developed obvious GVHD.
- In some children, maternal cells were found to be eliminated or decreased after infusions, indicating existence of host-versus-graft reaction.

Wang Q, *Blood* 2010;116: 5941

**Fetal-maternal microchimerism may favorably affect the survival of patients with advanced solid cancer receiving IL-2-activated PBSC infusions from HLA-haploidentical parents or children**

- A total of 42 patients with advanced stage of solid cancer refractory to conventional chemotherapy were treated with IL-2-activated PBSCs donated from their HLA-haploidentical parents or children.
- Patients receiving haplo-PBSCs with KIR-ligand incompatibility in the graft-versus-host direction had higher probability of OS (26.8  $\pm$  3.1 months) and PFS (13.4  $\pm$  1.3 months) when compared with those with KIR ligand compatibility (OS: 17.4  $\pm$  3.0 months,  $p < 0.05$  and PFS: 8.0  $\pm$  0.9 months,  $p < 0.05$ ).
- Further, OS (31.2  $\pm$  4.3 months), PFS (14.7  $\pm$  2.2 months) in the microchimerism-positive group was improved compared with those in the microchimerism-negative group (OS: 16.9  $\pm$  3.8 months,  $p < 0.01$ , PFS: 5.6  $\pm$  1.4 months,  $p < 0.01$ ).

Han Y, *Cancer Biother Radiopharm* 2010;25:741

**Acknowledgments**

下嶋 典子 奈良県立医科大学 細菌学教室  
石谷 昭子 奈良県立医科大学 法医学教室

吉岡 聡 京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学  
大森 勝之 京都大学医学部附属病院検査部

2011年1月30日 谷口班班会議

NIMA不一致移植における反応性予測の試み

三重大学医学部小児科・細胞移植

平山雅浩、東 英一

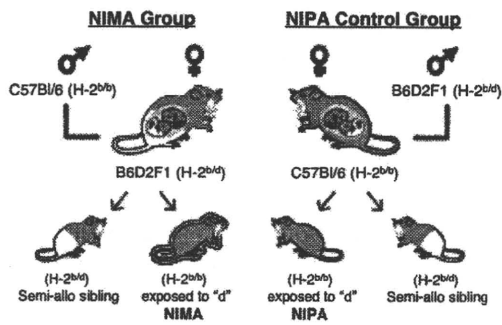
1

はじめに

- 1) Maternal microchimerism(MMc)の証明  
Maloney et al. *J.Clin. Invest.*, 1999
- 2) Noninherited maternal antigen(NIMA) toleranceと造血移植の応用  
Inchinoe et al. *Blood*, 2004  
Andressy et al. *J. Immunol.*, 2003  
Matsuoka K, et al. *Blood*, 2006  
Dutta et al. *Blood*, 2009
- 3) NIMA; Tolerogenic vs. immunogenic effect  
Okumura et al. *Eur. J. Haematol.*, 2007  
Kanda et al. *Bone Marrow Transplant.*, 2009  
Molltor-Dart et al. *Am. J. Transplant.*, 2008
- 4) NIMA不一致移植のGVHD予測について:  
NIMA抗原としてMiHA(Minor histocompatibility antigen)一致でMHC不一致の独自のマウスモデルを作成し、MLR-ELISPOT法を用いてGVHD反応性の評価を行った。  
Hirayama & Azuma et al. *J. Immunol.*, 2010

2

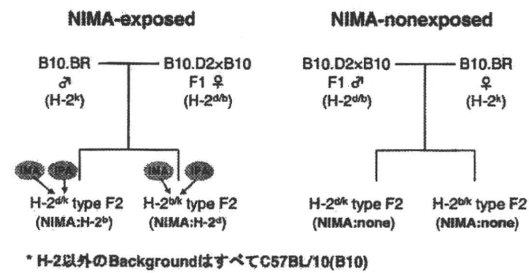
従来のNIMAマウスモデル



Burlingham et al. *J. Immunol.* 171:5554-5561, 2003

3

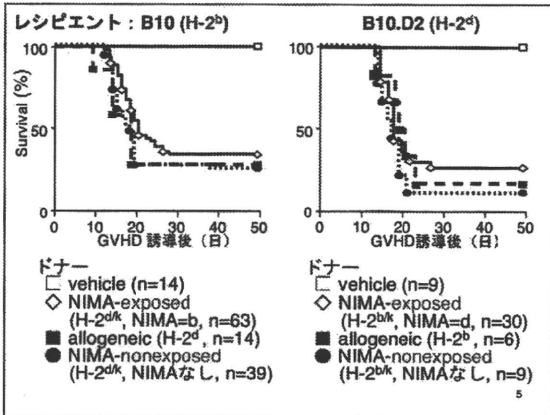
本研究のマウスモデル



\* H-2以外のBackgroundはすべてC57BL/10(B10)

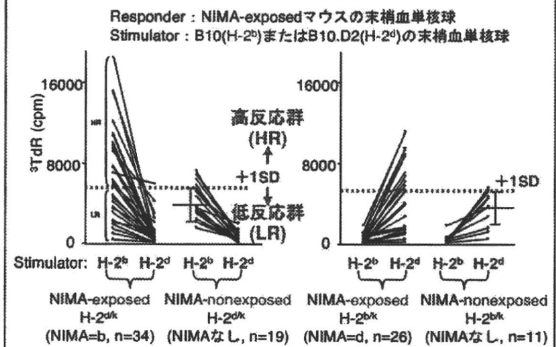
Hirayama & Azuma et al. *J. Immunol.* 185:7739-7745, 2010

4

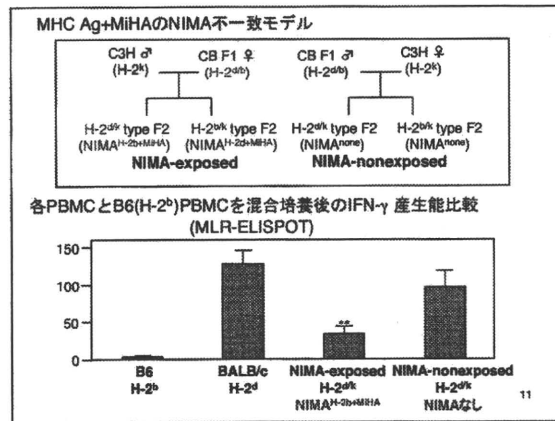
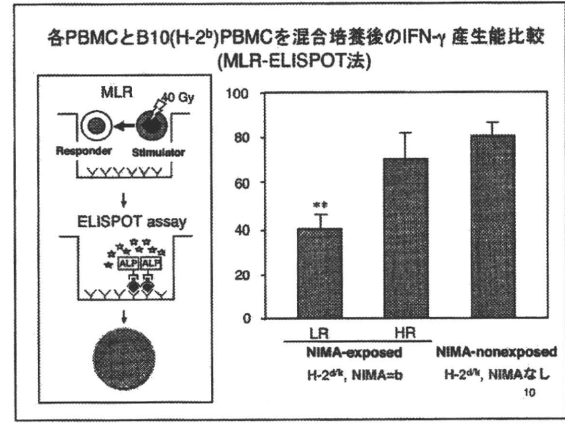
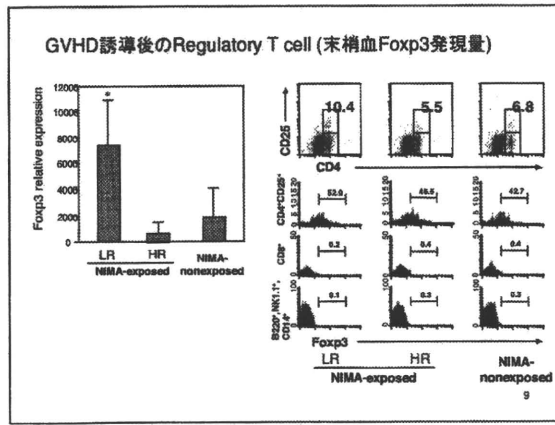
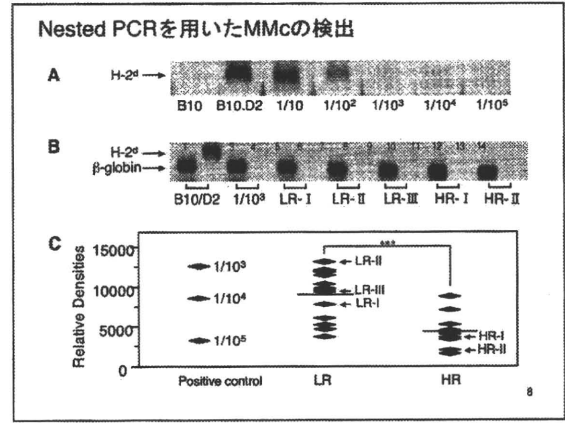
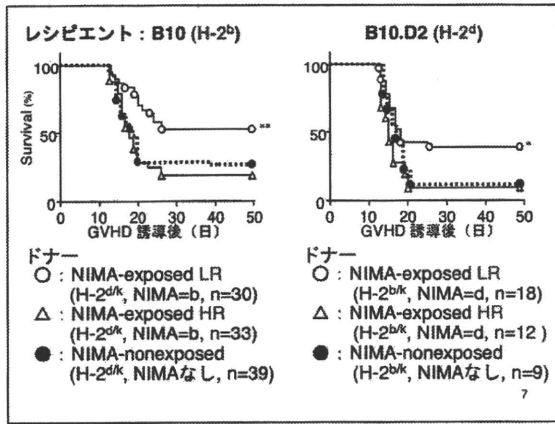


5

リンパ球混合反応



6



MiHA一致でH-2不一致のNIMAモデルで以下の事が判明した。

- 1) この系においてはNIMAのtolerance効果は示されなかった。
- 2) MLR反応性の違いからNIMA-exposedマウスを高反応群(HR群)、低反応群(LR群)に分けたところ、LR群ではHR群、NIMA-nonexposed群に比べ有意にGVHD抑制効果が高かった。
- 3) MMcおよびFoxp3の発現はLR群で有意に高く、個々のNIMA反応性はMMc移行とTreg誘導度に関連することが認められた。
- 4) MLR-ELISPOTによるIFN-γ産生能の測定ではLR群で有意に低く、反応性の予測が可能と考えられた。これにより臨床でのNIMA不一致移植のGVHD予測への応用が期待される。

12

## 血縁HLA半合致ミニ移植(haplo-mini)の 進捗と、ATGを用いたHLA半合致フル移植 (haplo-full with ATG)

兵庫医科大学 内科学講座 血液内科  
池亀和博、吉原哲、谷口享子、海田勝仁、小川啓恭  
富山県立中央病院 血液内科  
吉田喬

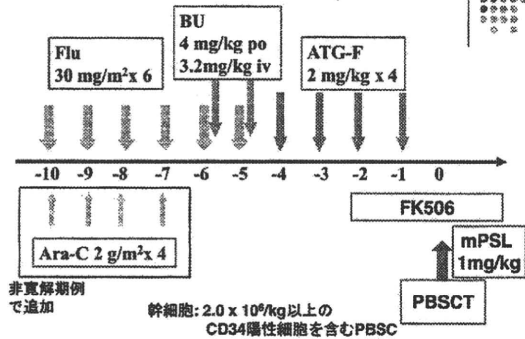
## 臨床試験の目的 (Primary endpoint)

第I相: day 35生存  
第II相: day 100生存

## 対象疾患

AML, ALL, CR1以外(PhALLのCR1は可)かつBM blast <30%  
GML, CP1以外  
MDS, MDS/MPD, Low以外  
ML nonCR

## 本臨床試験の移植 regimen (haplo-mini)



## 第II相 症例背景

#	病名	病期	年齢・性別	ドナー	HLA mis GvH/HvG	AraC	CD34 cells (x 10 <sup>9</sup> /kg)
001	MDS	RAEB	45M	Sib (P)	2/3	-	2.87
002	MDS	RAEB	57M	Son	3/3	+	3.95
003	AML M3	1 <sup>st</sup> Re	54M	Son	3/3	+	3.55
004	AML M1	3 <sup>rd</sup> Re	32F*	Mother	2/2	+	4.97
006	AML M1	CR1	34M**	Sib (U)	3/3	-	3.99
007	PhALL	CR1	47M	Son	2/3	+	3.62
008	AML	CR2	56F	Daughter	2/2	-	2.47
009	DLBCL	2 <sup>nd</sup> Re	43F	Sib (P)	2/3	+	4.02
010	MDS	RAEB	50M	Son	2/3	+	6.7
011	MDS	RAEB	53M	Nephew	3/3	+	2.32

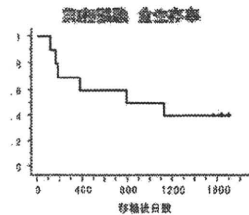
\* 顕著血移植後再発 \*\* 臓器障害 (除)  
(009は、登録後にfull blastであることが判明し前掲症前にプロトコル・オフ)

## 第I相試験 症例経過

#	肝中球 >500/ml	血小板 >2万/ml	aGVHD	免疫 抑制剤	PB	転帰
001	11	11	0			dead CR⇒Rel⇒再移植⇒死亡 (785)
002	14	14	I			dead CR⇒Rel⇒再移植⇒死亡 (163)
003	12	14	0	(-)	80	alive CR⇒Rel⇒GO+DL⇒CR (1697+)
004	12	12	0			dead nonCR⇒再移植⇒死亡 (181)
006	14	17	III <sup>1)</sup>	(-)	100	alive CR (1641+)
007	15	低下せず	I	(-)	100	alive CR (1631+)
008	10	10	0	(+)	100	alive CR (1588+)
009	11	11	I			dead CR⇒PCP⇒死亡 (CR, 379)
010	13	13	III <sup>2)</sup>	(+)		dead CR⇒TMA⇒死亡 (1130)
011	12	12	I			dead CR, GVHD⇒TMA⇒死亡 (115)

## 第II相試験のまとめ

- 前例、生存。
- 100日以内は重篤な有害事象なし。
- aGVHD II度以上は2例。
- 10例中全例が100日以上生存。



### 第II相 症例背景 (現在20例)

#	病名	病期	年齢・性別	ドナー	HLA mis GvH/HvG
101	AML	PIF	49F	Son	3/3
102	ALL	L2	59F	Daughter	2/1
103	MDS/ML	RA/PIF	52F	Sib	2/1
104	AML M4E	1 <sup>st</sup> Re	39F	Son	2/2
105	ALL	PIF	54F	Son	2/2
106	AML	PIF	51M	Son	2/3
107	MDS	RAEB	59M	Daughter	2/2
108	AML	PIF	50F	Daughter	2/2
109	ALL	GR2	51M	Son	2/2
110	ML	3 <sup>rd</sup> Re	53M	Daughter	2/2

#	病名	病期	年齢・性別	ドナー	HLA mis GvH/HvG
111	FL	1 <sup>st</sup> Re	49M	Son	2/3
112	MDS	RAEB	56M	Son	2/1
113	PTCL	Re(allo)	50F	Daughter	3/2
114	CML	CP2	54M	Daughter	2/3
115	AML	1 <sup>st</sup> Re	46M	Daughter	3/3
116	AML	PIF	42F	Son	
117	AML	Re(allo)	52M	Brother	3/2
118	AML	PIF	56F	Son	2/3
119	Richter	PIF	55M	Son	2/3
120	PhALL	Re(allo)	60M	Daughter	3/2

登録施設： 富山県立中央病院、兵庫医科大学、倉敷中央病院、岡山大学、済生会前橋病院

### 現在の状況

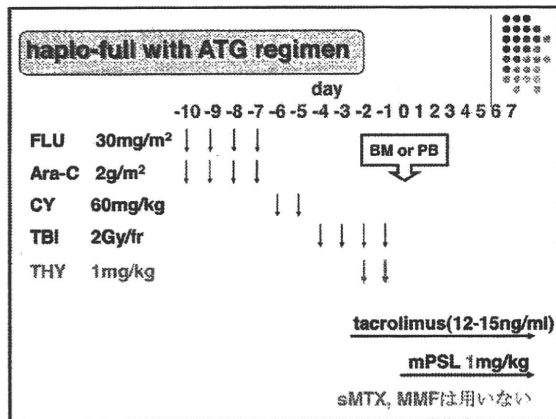
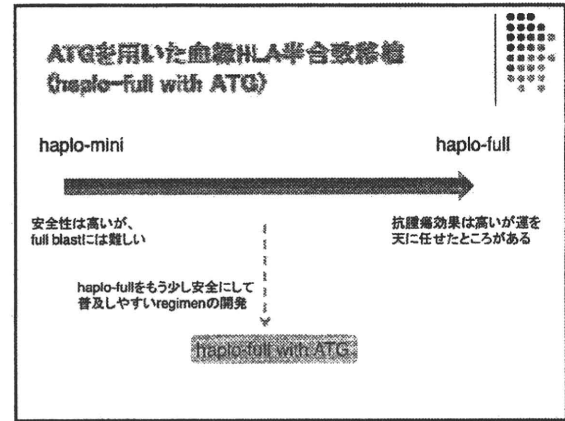
第I相10例に引き続き、現在第II相試験を施行中 (現在20例)。目標症例数は、第I相、第II相合わせて、35例 (あと5例)。

### 最近登録が入らない理由

Blast >30%の症例が多い。  
よりaggressiveな症例には、BUをMEL 140mg/m<sup>2</sup>に変更して用いることが多くなった。

↓

(多少、原病が悪くても登録しよう)



### ATGを用いたHLA半合致移植 (haplo-full with ATG)

No.	Pt	age/sex	disease	stage	tumor burden
No. 1	Y.H.	39F	AML-TLD	CR1(MRD)	blast 0.8%, WT1 23000copy
No. 2	O.Y.	34F	ALL	Re1	blast 40%, MLL-FISH 65%
No. 3	S.M.	39F	CMMoL	AML	blast 10%
No. 4	N.C.	44F	AML	RR1	blast 70%
No. 5	A.H.	43M	AML	Re1	blast 67%
No. 6	T.M.	33M	T-ALL	CR1(MRD)	blast 1.2%, WT1 32000copy

ATGを用いたHLA半合致移植  
(haplo-full with ATG)



No.	conditioning	GVH/HVG	donor	source	GVHD prophylaxis
No. 1	FLU/CA/CY/8Gy/ATG8	3/2	son	PB	TAC/mPSL2
No. 2	FLU/CA/CY/8Gy/THY4	2/2	daughter	PB	TAC/mPSL1/sMTX1
No. 3	FLU/CA/CY/8Gy/THY2	3/3	son	PB	TAC/mPSL1
No. 4	FLU/CA/CY/8Gy/THY2	3/2	cousin	BM	TAC/mPSL1
No. 5	FLU/CA/CY/8Gy/THY2	2/3	son	PB	TAC/mPSL1
No. 6	FLU/CA/CY/8Gy/THY2	3/3	mother	PB	TAC/mPSL1

ATGを用いたHLA半合致移植  
(haplo-full with ATG)



2011/1/11 現在

No.	Neu-500	Pit-2万	d30 PSL	OS	current status/cause of death
No. 1	d11	d24	28mg	830+	CR
No. 2	d11	d51	12mg	335	Mol. Reで再移植、IPSで死亡
No. 3	d16*	d34*	10mg	329+	HLA-Ab(DSA)で拒絶、CR
No. 4	d11	d40	33mg	143+	CR
No. 5	d9	d56	40mg	123+	CR
No. 6	d10	d22	34mg	102+	CR

## VIII. 研究成果の刊行物・印刷

# Combination of Intra-Bone Marrow–Bone Marrow Transplantation and Subcutaneous Donor Splenocyte Injection Diminishes Risk of Graft-Versus-Host Disease and Enhances Survival Rate

Ming Shi,<sup>1,\*</sup> Yasushi Adachi,<sup>2,3,\*</sup> Yunze Cui,<sup>1,4</sup> Ming Li,<sup>1</sup> Zhexiong Lian,<sup>5</sup> Yuming Zhang,<sup>6</sup> Seiji Yanai,<sup>2</sup> Chieko Shima,<sup>2</sup> Yuichiro Imai,<sup>2</sup> and Susumu Ikehara<sup>1</sup>

The combination of allogeneic bone marrow transplantation (allo-BMT) and donor lymphocyte infusion (DLI) is a useful method for establishing donor chimerism and preventing a relapse of leukemia/lymphoma. However, there is a risk of inducing uncontrollable fatal graft-versus-host disease (GVHD). In fact, allo-BMT plus intravenous (IV)-DLI using donor splenocytes induces fatal GVHD in recipient mice. In this study, we examined the effects of the combination of intra-bone marrow (IBM)-BMT and the subcutaneous injection of donor splenocytes (SC-DLI) on the allo-BMT system. Recipient BALB/c mice were conditioned by sublethal irradiation (5 Gy), followed by IBM-BMT plus IV-DLI or SC-DLI in C57BL/6 mice. The IV-DLI group showed better engraftment of donor hemopoietic cells than the control group (without DLI) but showed fatal GVHD. The SC-DLI group, however, showed good reconstitution and mild GVHD. These results suggest that the combination of SC-DLI and IBM-BMT promotes the reconstitution of hemopoiesis and helps reduce the risk of GVHD.

## Introduction

**B**ONE MARROW TRANSPLANTATION (BMT) was initially developed as a cure for certain diseases of the hematopoietic system such as aplastic anemia, leukemia, and immunodeficiencies [1–3]. Since then, BMT has been widely used for the treatment of autoimmune diseases, solid malignant tumors, multiple myelomas, myelodysplastic syndrome, and so on [4–9]. Allogeneic-BMT (allo-BMT) is becoming more common owing to the discovery of more effective immunosuppressants, more powerful antibiotics, antithymocyte globulin, and fractionated irradiation [10–12]. Recently, we developed a new and powerful BMT method: intra-bone marrow (IBM)-BMT [13]. In this method, donor bone marrow cells (BMCs) are directly injected into the recipient's bone marrow (BM). A much greater number of donor hemopoietic stem cells and mesenchymal stem cells can therefore be inoculated into the recipient BM than by conventional intravenous BMT (IV-BMT). This results in rapid reconstitution of donor hemopoietic cells and permits a reduction in radiation doses as a pretreatment for BMT [14–16].

Donor lymphocyte infusion (DLI) is often used after allo-BMT to prevent disease relapse in the setting of T-cell-depleted BMT or nonmyeloablative conditioning regimens. It is also a combined method to convert mixed chimerism to full donor chimerism [17,18]. Donor T cells injected intravenously during DLI are activated in the host's lymphoid tissues, which then migrate to the target tissues of graft-versus-host disease (GVHD) and then mediate the GVHD. DLI, which is used as the combined conditioning therapy for BMT, helps to reduce relapse rates. However, DLI-induced GVHD is always associated with an increase in therapy-related morbidity because of its uncontrollable and fatal characteristics [19–26]. A key challenge for DLI is to balance the positive and negative effects of donor T cells in order to optimize the outcome.

In mice, allo-BMT plus IV-DLI using donor splenocytes can induce fatal GVHD due to the donor T-cell infiltration and proliferation in the GVHD target tissues such as the liver, spleen, intestine, and skin [27]. In this study, we examined the localizable effects of donor T cells (splenocytes) by subcutaneous injection (SC) of donor splenocytes in the

<sup>1</sup>Department of Stem Cell Disorders, <sup>2</sup>First Department of Pathology, and <sup>3</sup>Regeneration Research Center for Intractable Diseases, Kansai Medical University, Moriguchi City, Osaka, Japan.

<sup>4</sup>JIMRO Co., Ltd., Takasaki, Gunma, Japan.

<sup>5</sup>Institute of Immunology and School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei, China.

<sup>6</sup>Department of Pediatrics, Nanfang Hospital, Guangzhou, China.

\*These two authors contributed equally to this work.



allo-BMT system using a preconditioning regimen (sublethal irradiation). Compared with IV-DLI plus IBM-BMT, the SC-DLI plus IBM-BMT group showed good reconstitution and only mild GVHD. The survival rate in the SC-DLI group was much higher than in the IV-DLI group. These results suggest that the combination of SC-DLI and IBM-BMT promotes reconstitution of hemopoiesis and helps to reduce the risk of fatal GVHD.

## Materials and Methods

### Mice

C57BL/6 mice (B6) and BALB/c were purchased from Shimizu Laboratory Supplies (Shizuoka, Japan). All the mice were maintained in a pathogen-free room, and 8–10-week-old male mice were used in the present studies. The university's committee for animal research approved all experiments.

### Reagents

The antibodies used in this study were as follows: fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-mouse H-2<sup>b</sup> Ab, phycoerythrin (PE)-labeled anti-mouse H-2<sup>d</sup> Ab, peridinin chlorophyll protein (PerCP)-Cy5.5-labeled anti-mouse CD45 Ab, and anti-mouse CD3 Ab (BD Pharmingen, San Diego, CA). Lysing buffer (BD Pharmingen) was used for the lysis of erythrocytes. Collagenase type IV, used for hepatocyte isolation, was purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

### Whole-body irradiation of recipient mice

Gamma-irradiation was delivered by a Gammacell 40 Exactor (MDS Nordion, Kanata, ON, Canada) with two <sup>137</sup>Cs sources. Recipient mice were irradiated with 6, 5, or 4 Gy, the day before BMT.

### IBM-BMT

BMCs were flushed from the medullary cavities of the femurs and tibias of donor mice with phosphate-buffered saline (PBS). After gentle dissociation, the BMC suspension was filtered through a 70- $\mu$ m nylon mesh (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ). The BMC suspension was then centrifuged and the supernatant was aspirated. The BMCs

were adjusted to  $3 \times 10^9$  per mL. The thus-prepared BMCs ( $3 \times 10^7$ ) were injected directly into the tibial cavity of the recipient mice via the intra-bone marrow route (IBM-BMT) the day after irradiation, as previously described [13]. Briefly, the mice were anesthetized and the area from the inguinal region to the knee joint was shaved. The tibia was gently drilled with a 26-G needle through the patellar tendon into the BM cavity. The BMCs ( $3 \times 10^7/10 \mu$ L) were then injected into the BM cavity using a microsyringe (50  $\mu$ L; Ito, Fuji, Shizuoka, Japan).

### Donor lymphocyte infusion

Spleens were removed from donor B6 mice and then minced with scissors. Single cells were prepared by milling in steel mesh, followed by filtering through a 70- $\mu$ m nylon mesh in PBS containing 2% fetal calf serum. After centrifugation, the pellets were suspended in 1 $\times$ lysis buffer and kept for 15 min at room temperature for the lysis of erythrocytes. The erythrocyte-depleted splenocytes were adjusted to  $5 \times 10^7/0.2$  mL ( $2.5 \times 10^8$  per mL) in PBS and were then injected intravenously into the tail vein in the IV-DLI group or subcutaneously in the back in the SC-DLI group. Figure 1 shows the experiment protocol, including the days for treatment.

### GVHD analysis and scoring

The recipients were monitored daily for survival, and every 5 days for body weight changes and clinical signs of GVHD after BMT. The clinical scoring was based on 6 parameters: weight loss, posture, activity, fur texture, skin integrity, and diarrhea. A severity scale of 0 to 2 was used for each parameter, with a maximum score of 12 (Table 1). Clinical signs early after transplantation due to radiation toxicity were not considered as the appearance of GVHD [28,29].

The carcasses of the recipients that had died or had been sacrificed at 3 months after BMT were kept in 10% formalin. Tissues from GVHD target organs (liver, intestine, and skin) were embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin. Slides were observed using an Olympus BX41 light microscope (Olympus, Tokyo, Japan) with a UPlanFL N 20 $\times$ /0.50 objective. An Olympus DP-25 color camera using DP2-BSW software was used to acquire the images.

**FIG. 1.** Experiment protocol. The days of irradiation, BMT, and DLI are shown. The observed days of T-cell infiltration, reconstitution, and the analyses of histopathological scoring are also shown. BMT, bone marrow transplantation; DLI, donor lymphocyte infusion.

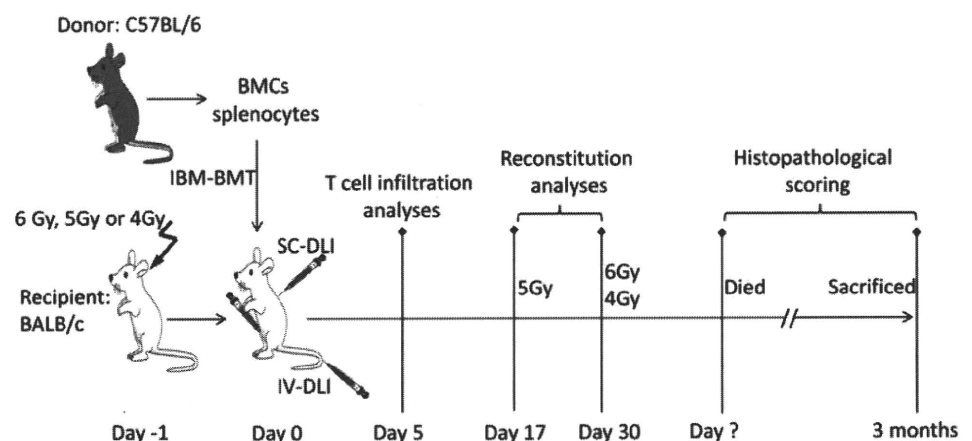


TABLE 1. CLINICAL SIGNS AND SCORING OF GVHD

Parameters	Scale 0	Scale 1	Scale 2
Weight loss	~10%	10%–25%	~25%
Posture	Normal	Hunching noted only at rest	Severe hunching impairs movement
Activity	Normal	Mildly to moderately decreased	Stationary unless stimulated
Fur texture	Normal	Mild to moderate ruffling	Severe ruffling/poor grooming
Skin integrity	Normal	Scaling of non-hair-bearing skin	Obvious areas of denuded skin
Diarrhea	Normal	Bits of residual perianal fecal material	A mass of residual perianal fecal material

The clinical signs of GVHD (based on 6 parameters: weight loss, posture, activity, fur texture, skin integrity, and diarrhea) were scored every 5 days after bone marrow transplantation. A severity scale of 0 to 2 was used for each parameter, with a maximum score of 12. GVHD, graft-versus-host disease.

Histopathological analysis was performed “single blind” by scoring the changes in the skin (dermal/epidermal lymphocyte infiltration, dyskeratotic epidermal keratinocytes, and epidermal thickening), the intestine (crypt regeneration, apoptosis in crypt epithelial cells, crypt loss, surface colonocyte attenuation, inflammatory cell infiltration in lamina propria, mucosal ulceration, and thickening of mucosa), and the liver (bile duct injury manifested by nuclear hyperchromasia, nuclear crowding, infiltrating lymphocytes, and cytoplasmic vacuolation and liver inflammation due to the infiltration of lymphocytes, neutrophils, and eosinophils). A severity scale from 0 to 4 was used, with a maximum score of 12 (Table 2) [29,30].

**Analyses of donor cells in recipient peripheral blood, spleen, or liver by FACS**

To detect the reconstitution of the recipients, the peripheral blood (PB) of the recipient mice was collected 17 days or 1 month after BMT. The PB was stained with FITC-labeled anti-H-2<sup>b</sup> Ab, PE-labeled anti-mouse H-2<sup>d</sup> Ab, and PerCP-Cy5.5-labeled anti-CD45 Ab. The erythrocytes were then lysed using lysing buffer. The stained cells were analyzed using FACScan (BD Biosciences, San Jose, CA). Leukocytes were first gated by CD45<sup>+</sup> cells, which were estimated as nuclear cells. The percentage of donor leukocytes was estimated as H-2<sup>b+</sup>/CD45<sup>+</sup> cells.

To detect donor-derived T cells infiltrating the GVHD target tissues at 5 days after BMT, mononuclear cells (MNCs) from the recipient’s spleen and liver were collected as follows: 0.5 mg/mL collagenase type IV solution was prepared by PBS dilution, and then after euthanasia, 2 mL collagenase solution was injected intraperitoneally in the recipient mice. The spleen and liver were surgically excised and a single-cell suspension was prepared. The spleen and liver MNCs were then isolated by Lymphoprep (AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norway). The MNCs were stained with FITC-labeled anti-H-2<sup>b</sup> Ab, PE-labeled anti-mouse H-2<sup>d</sup> Ab, and PerCP-Cy5.5-labeled anti-CD3 Ab. The percentage of donor T cells was analyzed by FACScan estimated as H-2<sup>b+</sup>/CD3<sup>+</sup> cells.

**Statistical analysis**

Survival data were analyzed using the Kaplan–Meier method in the Stat Mate software. Other results are represented as means ± standard deviation (SD). The Student’s *t*-test was used to determine any statistical significance. A *P* value of <0.05 was considered to be a significant difference.

**Results**

**No GVHD occurs in the BMT-only group**

Previous studies have shown that, in contrast to humans and other primates, no or only mild GVHD is observed in the

TABLE 2. HISTOPATHOLOGICAL GVHD SCORING

Organ	Parameters	Scale 0	Scale 0.5	Scale 1	Scale 2	Scale 3	Scale 4
Skin	Dermal/epidermal lymphocyte infiltration, dyskeratotic epidermal keratinocytes, and epidermal thickening						
Intestine	Crypt regeneration, apoptosis in crypt epithelial cells, crypt loss, surface colonocyte attenuation, inflammatory cell infiltration in lamina propria, mucosal ulceration, and thickening of mucosa	Normal	Focal and rare	Focal and mild	Diffuse and mild	Diffuse and moderate	Diffuse and severe
Liver	Bile duct injury, infiltrating lymphocytes, and cytoplasmic vacuolation and liver inflammation						

Histopathological GVHD scoring was performed based on the changes in 3 GVHD target organs: the skin, intestine, and liver. A severity scale of 0 to 4 was used for each organ, with a maximum score of 12.

case of allo-BMT without DLI in the murine setting [31–33]. To confirm this, BMCs from B6 mice were transplanted into sublethally irradiated (6, 5, or 4 Gy) BALB/c recipients by IBM-BMT (control group). All the control groups (6, 5, or 4 Gy) survived until 90 days after BMT (Fig. 2). No severe complications, such as fatal GVHD, occurred in the BMT-only control group according to clinical observations (Fig. 4) and histopathological evaluation (Fig. 5).

### The SC-DLI group shows lower mortality than the IV-DLI group

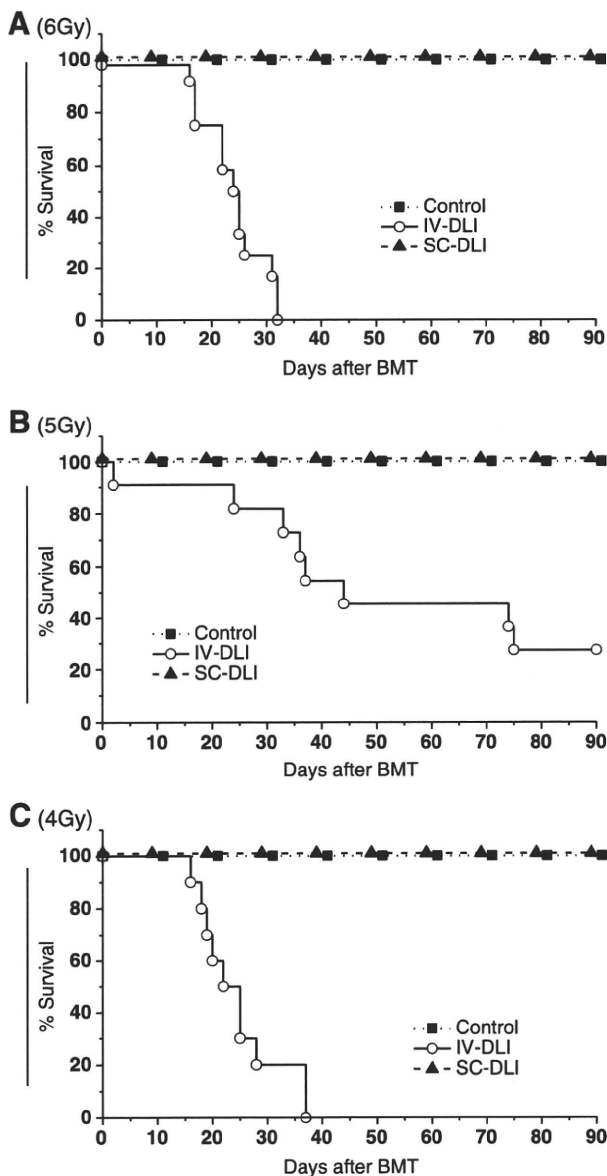
The PB and spleen are commonly used as the source of lymphocytes for DLI. In the present study, we carried out DLI using the erythrocyte-depleted splenocytes ( $5 \times 10^7$  per mouse). After BMT, the recipients were monitored daily for survival. For the 6 Gy irradiated mice, all the mice in the IV-DLI group died within 32 days after BMT (Fig. 2), whereas all the mice in the SC-DLI group survived until 90 days after BMT. Similarly, high mortality rates were also observed in the IV-DLI group for 5 or 4 Gy irradiated recipients. To our surprise, the 5 Gy IV-DLI group showed significantly improved survival compared with the 4 Gy IV-DLI group. In contrast to the high mortality caused by IV-DLI, the SC-DLI groups (6, 5, or 4 Gy) showed a 100% survival rate, as seen in the control groups (Fig. 2).

### Better reconstitution of donor hemopoietic cells is observed in both the IV-DLI and SC-DLI groups than the control group (without DLI)

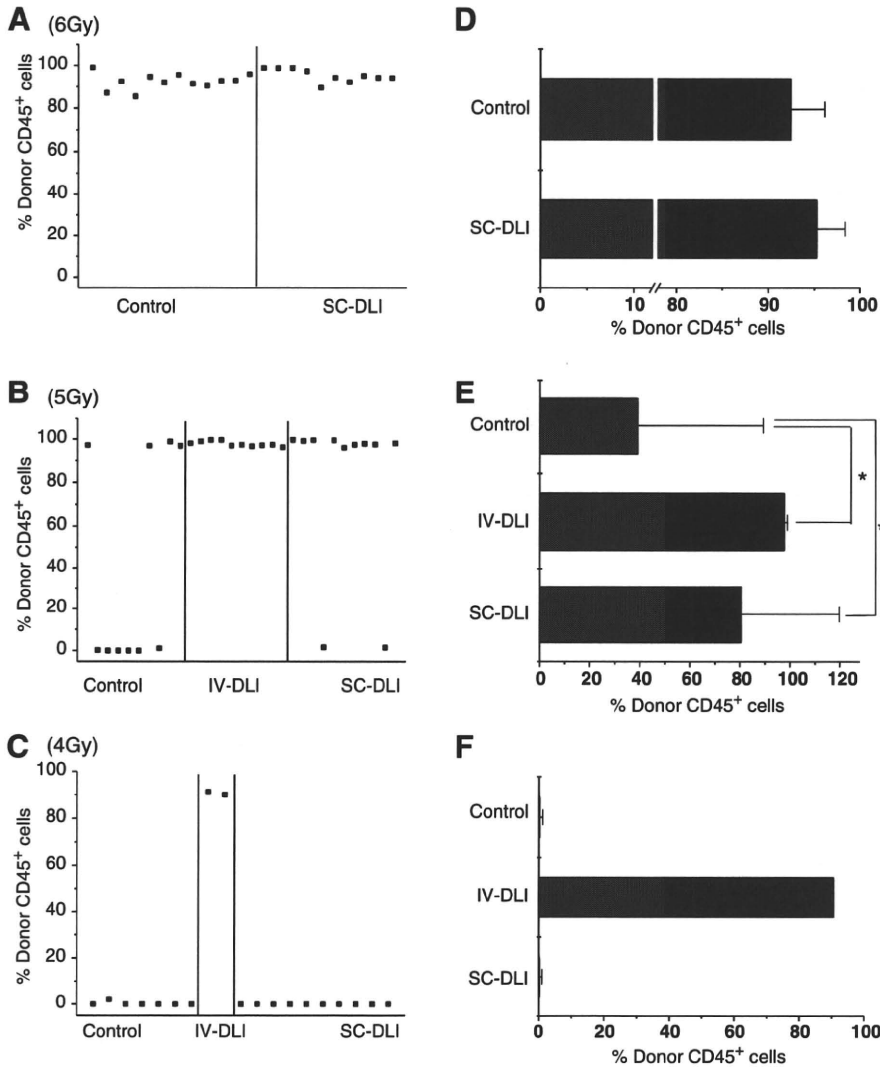
Next, we examined the reconstitution degree of the recipients with donor-type cells in the PB of the recipient mice after BMT. In the experiment with preconditioning with 6 Gy irradiation, the PB was collected from the surviving recipient mice to analyze the chimerism at 1 month after BMT. All the recipients of IBM-BMT, either combined with DLI or not, showed nearly complete donor-type (H-2<sup>d</sup>) hematopoietic cells (Fig. 3A). Moreover, there was no significant difference between the control group and the SC-DLI group: the mean and SDs of the percentages of donor hematopoietic cells were  $92.4\% \pm 3.7\%$  and  $95.3\% \pm 3.1\%$ , respectively (Fig. 3D). We therefore reduced the radiation dose to 5 Gy. With 5 Gy, reconstitution was examined earlier (on day 17). Donor-type hematopoietic cells were detected in 4 of 10 control group recipients, 10 of 10 IV-DLI group recipients, and 9 of 11 SC-DLI group recipients (Fig. 3B). Statistically significantly higher percentages of reconstitution with donor cells were observed in the SC-DLI group than in the control group, and there was no significant difference between the IV-DLI and SC-DLI groups (Fig. 3E). Moreover, better reconstitution was confirmed by long-term (not transient) chimerism (data not shown). When the radiation dose was reduced to 4 Gy, neither the control group nor the SC-DLI group could reconstitute the recipients with donor BMCs. The two survivors in the IV-DLI group showed donor-type hematopoietic cells but these mice died soon (Fig. 3C, F).

### Serious GVHD is observed in the IV-DLI group

After BMT, clinical signs of GVHD in the recipients (including weight loss, posture, activity, fur texture, skin integrity, and diarrhea) were assessed every 5 days and the score was calculated. In the 6 Gy IV-DLI group, all the recipient mice showed hunchback; several showed loss of weight, inaction, ruffled fur texture, and slight diarrhea on day 15. The signs of GVHD became progressively more serious: angular, severe hunching, stationary unless stimulated, severe ruffling, obvious areas of denuded skin, and severe diarrhea. The clinical score reached a peak on day 30:  $7.33 \pm 0.58$ . No obvious signs of GVHD appeared in the other



**FIG. 2.** IV-DLI shortens the survival but SC-DLI does not. Recipient (BALB/c) mice were irradiated at 6 Gy (A), 5 Gy (B) or 4 Gy (C) on day  $-1$ . Bone marrow cells ( $3 \times 10^7$ ) from donors (B6) were injected by intra-bone marrow-BMT with or without  $5 \times 10^7$  splenocytes DLI on day 0. The splenocytes were injected intravenously into the tail vein in the IV-DLI group or subcutaneously in the back side in the SC-DLI group.  $n \geq 10$ . IV, intravenous; SC, subcutaneous.



**FIG. 3.** Reconstitution in different irradiation doses. Recipient mice were irradiated with 4, 5, or 6 Gy on day -1. BMT and DLI were carried out on day 0. Peripheral blood of 6 Gy (A and D) and 4 Gy (C and F) irradiated mice was analyzed for reconstitution at 1 month after BMT. In the 5 Gy (B and E) experiment, peripheral blood was analyzed on day 17. Each small square (■) represents the percentage of reconstitution for each mouse in the left panels. The right panels show the percentage of donor CD45<sup>+</sup> by means ± standard deviation. \*P < 0.05.

two groups:  $0.25 \pm 0.87$  (control group) and  $0.50 \pm 0.71$  (SC-DLI group) (Fig. 4A). In the 5 Gy experiment, the clinical scores in the control group, IV-DLI group, and SC-DLI group were  $0.10 \pm 0.31$ ,  $6.44 \pm 2.60$ , and  $0.81 \pm 0.30$ , respectively, according to observations on day 30. The mice in the IV-DLI group retained the tendency to develop serious GVHD during the period from day 30 to day 70. The other two groups displayed mild GVHD (Fig. 4B).

In the 4 Gy experiment, the IV-DLI group displayed moderate but not severe GVHD, [although the recipient mice survived short-term (they died between days 16 and 37)]. Pathological diagnosis after autopsy indicated that infection due to graft failure (not GVHD) was the cause of death (data not shown). The clinical score was 4.00 (only two mice survived) on day 30 (Fig. 4C). It is not surprising that no GVHD was observed in either the control group or the SC-DLI group due to a failure of reconstitution.

**GVHD is main cause of death in the IV-DLI group**

We next examined the histopathological changes in the liver, skin, and intestine from randomly selected recipient mice that had died in the IV-DLI group or were sacrificed at

3 months after BMT in the control group and the SC-DLI group (four mice per group). The severity of histopathological GVHD nearly paralleled the clinical signs. In the IV-DLI group, either 6- or 5-Gy-irradiated recipients showed lymphocyte infiltration in the bile duct, epidermal thickening, and dermal lymphocyte infiltration, occasional crypt apoptosis, and mild inflammation in the intestine (Fig. 5A, C). The pathological scores in the IV-DLI group in the 6 and 5 Gy experiments were  $5.75 \pm 0.43$  and  $5.67 \pm 0.47$ , respectively (Fig. 5B, D). In the control group and the SC-DLI group, no or only mild lesions were found in the GVHD target tissues, even in the skin at the site of the injection of splenocytes. The pathological scores in these two groups were also significantly lower than in the IV-DLI group in either radiation dose experiment. These data indicated that GVHD was the main cause of death in the IV-DLI group and that DLI via the SC route could diminish the risk of fatal GVHD.

**SC-DLI reduces donor T-cell infiltration into GVHD target tissues**

Previous studies reported that donor T cells reached a peak on day 5 after expansion and infiltration into target