

平成 28 年 5 月 26 日

厚生労働大臣 殿

住 所 〒603-8437 京都市北区大宮開町12  
フリカナ

研究者 氏 名 ソノダ ヨシアキ 印  
( 所属研究機関 園田 精 昭 関西医科大学 )

平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等政策研究事業(免疫アレルギー疾患等政策研究事業(移植医療基盤整備研究分野)))に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

非血縁者間臍帯血移植における移植造血幹細胞数と移植成績の相関-  
移植用臍帯血有効利用への応用-(H27-難治等(免)-一般-101)

研究課題名(課題番号)：非血縁者間臍帯血移植における移植造血幹細胞数と移植成績の相関-  
移植用臍帯血有効利用への応用-(H27-難治等(免)-一般-101)

国庫補助金精算所要額 : 金 5,124,000 円也(うち間接経費 1,000,000 円)

1. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添1のとおり)
2. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次 (別添2のとおり)
3. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書 (別添3のとおり)
4. 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (該当事項なし)
5. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添4のとおり)
6. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況 (該当事項なし)
7. 健康危険情報 (該当事項なし)

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患政策研究事業

(免疫アレルギー疾患等政策研究事業(移植医療基盤整備研究分野))

非血縁者間臍帯血移植における移植造血幹細胞数と移植成績の相関

-移植用臍帯血有効利用への応用-

(H27 - 難治等(免) - 一般 - 101)

平成27年度 総括研究報告書

研究代表者 藺田 精昭

平成28(2016)年5月

目次

・ 総括研究報告

非血縁者間臍帯血移植における移植造血幹細胞数と移植成績の相関 -移植用臍帯血有効利用への応用- に関する研究	-----	1
藺田 精昭		

**厚生労働科学研究費補助金  
（難治性疾患等政策研究事業  
（免疫アレルギー疾患等政策研究事業（移植医療基盤整備研究分野））**

**総括研究報告書**

**非血縁者間臍帯血移植における移植造血幹細胞数と移植成績の相関  
-移植用臍帯血有効利用への応用-**

**研究代表者 園田 精昭 関西医科大学教授**

**研究要旨**

非血縁者間臍帯血移植（UCBT）は、非血縁者間骨髓移植と並び、本邦における造血幹細胞移植の中で重要な移植法として確立され、近年、本邦において年間1,200例実施されている。しかしながら、その根幹をなす臍帯血（CB）に含まれる造血幹細胞（HSC）の本体は、十分に明らかにされていない。その結果、生着不全や造血回復の遅延などの臨床的な課題は未だに克服されていない。

本研究の目的は、移植用CBに含まれているHSC数を独自に開発した方法（Leukemia 28:1308, 2014）により正確に測定し、移植成績（特に、生着不全や造血回復）との関連を明らかにすることにより、安全で効率的なUCBTを確立することである。

**研究分担者：**

藤岡龍哉（関西医科大学幹細胞生物学・講師）  
松岡由和（関西医科大学幹細胞生物学・助教）  
野村昌作（関西医科大学第一内科・教授）  
藤田真也（関西医科大学第一内科・講師）  
藤村吉博（日本赤十字社近畿ブロック血液センター・所長）  
小川啓恭（兵庫医科大学血液内科・教授）  
井上雅美（大阪母子保健総合医療センター血液腫瘍科・主任部長）  
中前博久（大阪市立大学大学院医学研究科血液腫瘍制御学・准教授）  
畑中一生（大阪赤十字病院血液内科・副部長）  
中村文明（国立循環器病センター循環器統合情報センターデータ統合室・室長）  
浅野弘明（京都府立医科大学大学院保健看護学研究科・准教授）

**研究協力者：**

松本加代子（日本赤十字社近畿ブロック血液センター製剤三課・課長）

**A. 研究目的**

非血縁者間臍帯血移植（UCBT）は、非血縁者間骨髓移植と並び、本邦における造血幹細胞移植の中で重要な移植法として確立され、近年、本邦において年間1,200例実施されている。しかしながら、その根幹をなす臍帯血（CB）に含まれる造血幹細胞（HSC）の本体は、十分に明らかにされていない。その結果、生着不全や造血回復の遅延（特に、血小板回復）などの臨床的な課題は未だに克服されていない。

本研究の目的は、移植用CBに含まれているHSC数を独自に開発した方法（Leukemia

28:1308,2014 参照)により正確に測定し、移植成績(特に、生着不全や造血回復)との関連を明らかにすることにより、安全で効率的な UCBT を確立することである。

本研究の成果により、生着に必要なHSC数の基準値が明らかになれば、従来、臍帯血バンクの調整前基準以下で廃棄されていた多くの臍帯血を移植に用いること(臍帯血のリクルート)が可能になるものと期待される。その結果、事業経費の節減という大きなメリットも期待できる。加えて、臍帯血の品質保証(臍帯血バンクHP上で含まれているHSC数を明記する)が可能になると考えられる。

## B. 研究方法

### (移植用臍帯血中の HSC 数の測定法)

近畿さい帯血バンクより提供された残余濃縮臍帯血より有核細胞を分離、回収する。次いで、回収した有核細胞より免疫磁気ビーズを用いて 11 種類の分化抗原陰性(Lin<sup>-</sup>)細胞を単離する。得られた 11Lin<sup>-</sup>細胞は、7-AAD、18 種類の分化抗原に対する抗体、CD34 抗原および CD133 抗原に対する抗体を用いて多重染色し、3 laser 5 color FACS 法(別紙図 1)を用いて 18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>細胞の割合を測定する。その後、全有核細胞数と 18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>細胞の割合より、移植用臍帯血中に含まれる CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>細胞数を算定する。最終的に、限界希釈実験結果(別紙図 2)(CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 1/99 個、CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC1/142 個)に基づいて、移植用臍帯血中に含まれる CD34<sup>+</sup>および CD34<sup>-</sup>HSC 数を算出する(Leukemia 28:1308-1315,2014 参照)。

今年度は、CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>細胞分画に含まれている CD34<sup>+</sup>HSC 数の測定に焦点を絞って研究を進める。

### (統計解析方法)

CB に含まれる CD34<sup>+</sup>HSC 数を前述の方法で測定し、従来の指標である総有核細胞(TNC)数と CD34<sup>+</sup>細胞数との相関について統計学的に解析する。

今年度は、CB に含まれている CD34<sup>+</sup>HSC 数の多寡により、A 群(1,000 個以下)、B 群(1,000~10,000 個)、C 群(10,000 個以上)の 3 群に分類した。

有意差検定は、積率相関係数と順位相関係数を用いて行った。

### (倫理面への配慮)

本研究では、日本赤十字社近畿さい帯血バンクで調製開始基準(有核細胞数  $12 \times 10^8$  個以上、CD34<sup>+</sup>細胞数  $3 \times 10^6$  個以上)を満たすことが確認された臍帯血を対象とする。調製段階(濃縮後)において細胞数測定のために分取した検査用検体の残り(50~100  $\mu$ l の濃縮臍帯血(通常は廃棄される))を用いて、含まれている CD34<sup>+</sup>HSC 数を測定する。

従って、提供者よりの同意は各採取施設で予め得られている。また、前記した残余細胞が研究施設(関西科大学幹細胞生物学講座)に提供される際には、個々の臍帯血には識別番号のみが記載されている。このため、臍帯血提供者の個人情報研究施設で漏洩する危険性はないと考えられる。

臍帯血提供者には、近畿さい帯血バンクに登録された各臍帯血採取施設において、臍帯血移植の必要性や、採取に伴う母子の危険性が全くないこと、提供された臍帯血が患者様への移植だけでなく、一部の臍帯血は研究用にも使用されるという説明が担当医よりなされた上で、文書による同意が得られている。従って、本研究に際して、研究担当者が直接に同意を求めるとはしないと考えられる。

また、本研究は、近畿さい帯血バンクにおいて有核細胞の分離、濃縮、保存処理、及び総有

核細胞数や CD34+細胞数の測定が行われる際の残余細胞(通常は廃棄される)を用いて実施する。従って、本研究が臍帯血提供者に直接の不利益をもたらすことはないと考えられる。

以上を踏まえて、本研究の実施に関して、関西医科大学倫理審査委員会に申請し、承認(関医倫第 1428 号)されている。

### C. 研究結果

平成 27 年度は、平成 27 年 6 月～平成 28 年 3 月の 10 カ月間で、目標を上回る 361 本の CB に含まれる CD34+HSC 数の測定を行った。従来指標である TNC 数は、 $8.5 \sim 34.2 \times 10^8$  個(中央値  $14.8 \times 10^8$  個)、CD34+細胞数は、 $2.3 \sim 18.3 \times 10^6$  個(中央値  $4.2 \times 10^6$  個)であった。一方、CD34+HSC 数は、144～61,866 個(中央値 3,994 個)と幅広く分布していた。最大値/最小値比は 430 となり、臍帯血ユニット間の個体差が非常に大きいことが初めて明らかにされた(別紙表 1 参照)。

次に、CD34+HSC 数と TNC 数、CD34+細胞数との相関について、解析したすべての CB (361 本)を用いて統計学的に解析した。別紙図 3 に示すように、CD34+HSC 数と TNC 数、CD34+細胞数との間には相関が認められなかった。

前述したように、移植用臍帯血ユニットを、含まれている CD34+HSC 数により、A 群)1,000 個以下、B 群)1,000～10,000 個、C 群)10,000 個以上の 3 群に分類した。全体の CB の分布は、概算で A 群 10%、B 群 80%、C 群 10%の割合であった(別紙表 2)。

そこで、各群で、CD34+HSC 数と従来指標である TNC 数、CD34+細胞数との相関について、積率相関係数、順位相関係数を用いてさらに解析した。

CD34+HSC 数が 1,000 個以下の A 群では、CD34+HSC 数は、TNC 数と全く相関しなかつ

た。CD34+細胞数との相関係数は 0.5 程度であるが、寄与率は 25%程度であり、相関はないと考えられた(別紙図 4)。

次に、保存された CB の大半を占める CD34+HSC 数が 1,000～10,000 個の B 群で解析した。その結果、CD34+HSC 数は、TNC 数と CD34+細胞数と全く相関しなかった(別紙図 5)。

最後に、CD34+HSC 数が 10,000 個以上の C 群において解析したが、CD34+HSC 数は、TNC 数と CD34+細胞数と全く相関しなかった(別紙図 6)。

以上の結果より、今回測定した CD34+HSC 数は、従来指標である TNC 数、CD34+細胞数と全く相関しなかった。そこで、この 3 群間で背景因子(採取から調整開始までの時間、採取から解析開始までの時間、在胎週数、採取量、性別)に差がないか、解析した。C 群では、A、B 群に比べて TNC 数、CD34+細胞数が有意に多い傾向が認められたが、それ以外の因子では有意な差を認めなかった。

### D. 考察

今回の研究により、移植用臍帯血ユニットに含まれている CD34+HSC 数が、144～61,866 個(中央値 3,994 個)と幅広く分布していることが初めて明らかにされた。換言すると、臍帯血ユニット間の個体差が非常に大きいことが初めて明らかにされたと言える。また、移植臨床の現場において移植用臍帯血を選択する際に、HSC 活性の指標として最も重要視されている TNC 数、CD34+細胞数が、臍帯血ユニットに含まれている CD34+HSC 数を反映していないことが明らかにされた。

このことは、本邦において重要な移植法として確立されている UCBT の実地臨床において重要な意義を持っている。周知のように、UCBT

は、骨髄移植や末梢血幹細胞移植に比べて生着不全が多く、造血回復が遅延するなど臨床的な課題が多い。そこで、これらの課題を克服するためには、臍帯血ユニットに含まれている CD34+HSC 数を正確に測定し、移植後の成績（特に、移植後 100 日までの生着不全、造血回復）との相関を明らかにする前向き臨床研究が必須不可欠と考えられた。

本研究の成果により、UCBT における生着不全や造血回復の遅延などの臨床的な課題を克服する手掛かりが得られ、安全で効率的な UCBT の確立が期待される。

## **E. 結論**

従来、UCBT における HSC 活性の指標であった TNC 数、CD34+細胞数は、個々の臍帯血ユニットに含まれている CD34+HSC 数を正確に反映していないことが明らかにされた。今後、移植 CD34+HSC 数と移植後の造血回復、生着不全との相関を明らかにする前向き臨床研究が極めて重要になると考えられた。

## **F. 健康危険情報**

該当事項なし。

## **G. 研究発表**

### 1. 論文発表

該当事項なし。

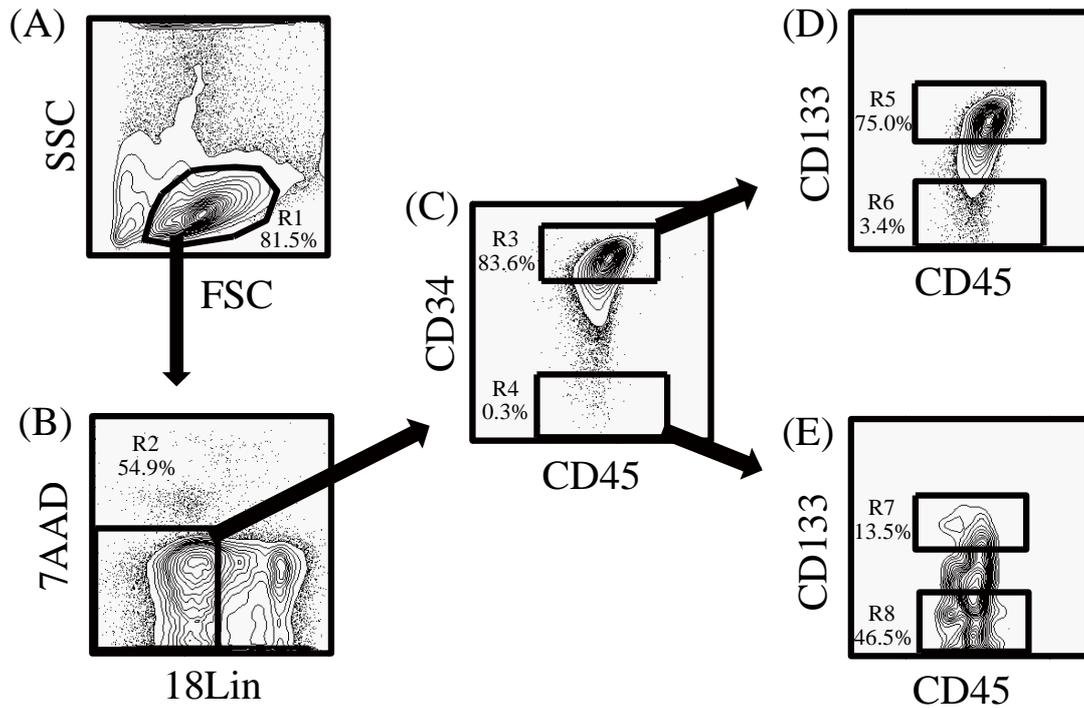
### 2. 学会発表

松岡由和、藤岡龍哉、角出啓輔、浅野弘明、松本加代子、藤村吉博、園田精昭：CD133 抗原を用いる移植用臍帯血の造血幹細胞活性評価法の開発 非血縁者間臍帯血移植への応用。第 38 回日本造血細胞移植学会総会、平成 28 年 3 月 4 日、名古屋。

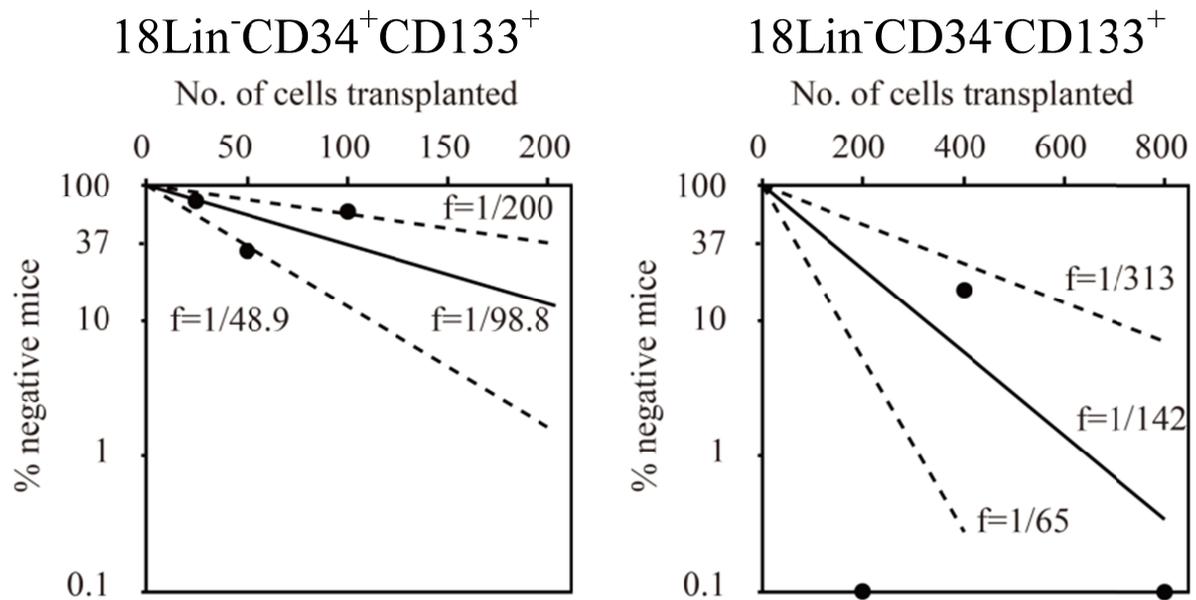
## **H. 知的財産権の出願・登録状況**

該当事項なし。

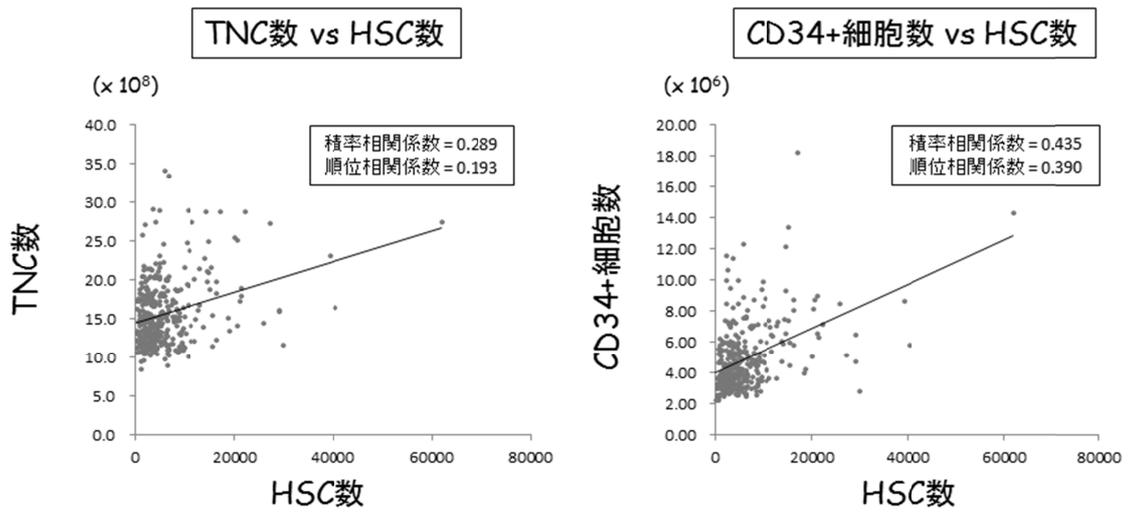
別紙 研究結果 (図表)



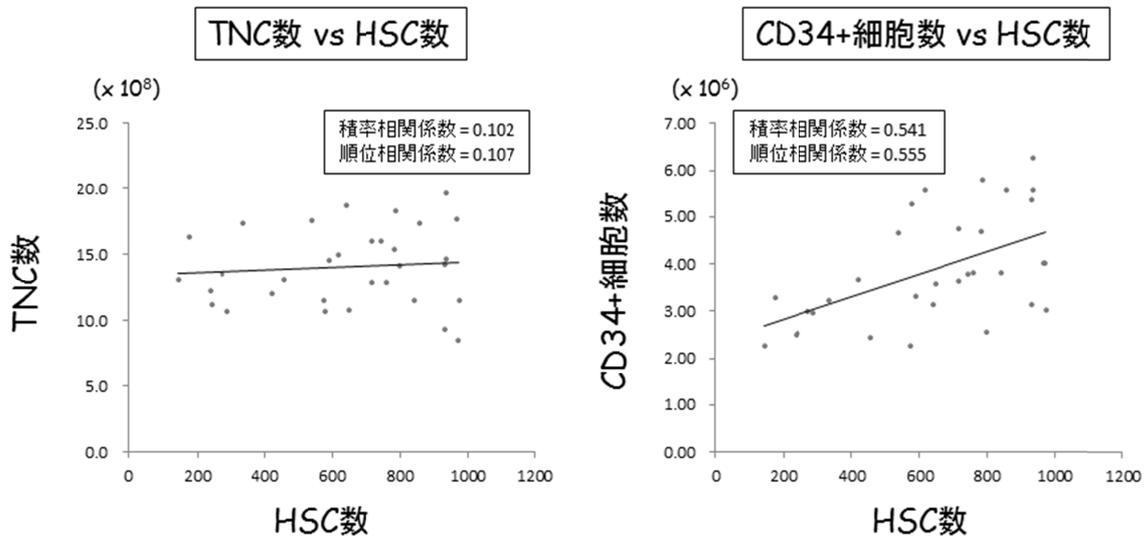
(图 1) HSC 測定法 (3 laser 5 color FACS 法)



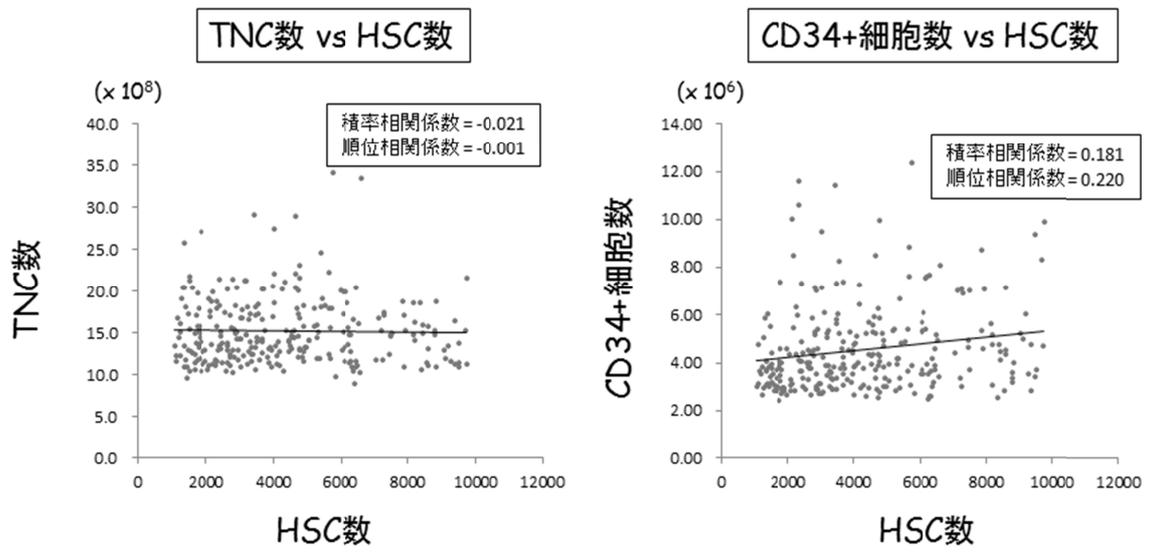
(图 2) 限界希釈実験結果



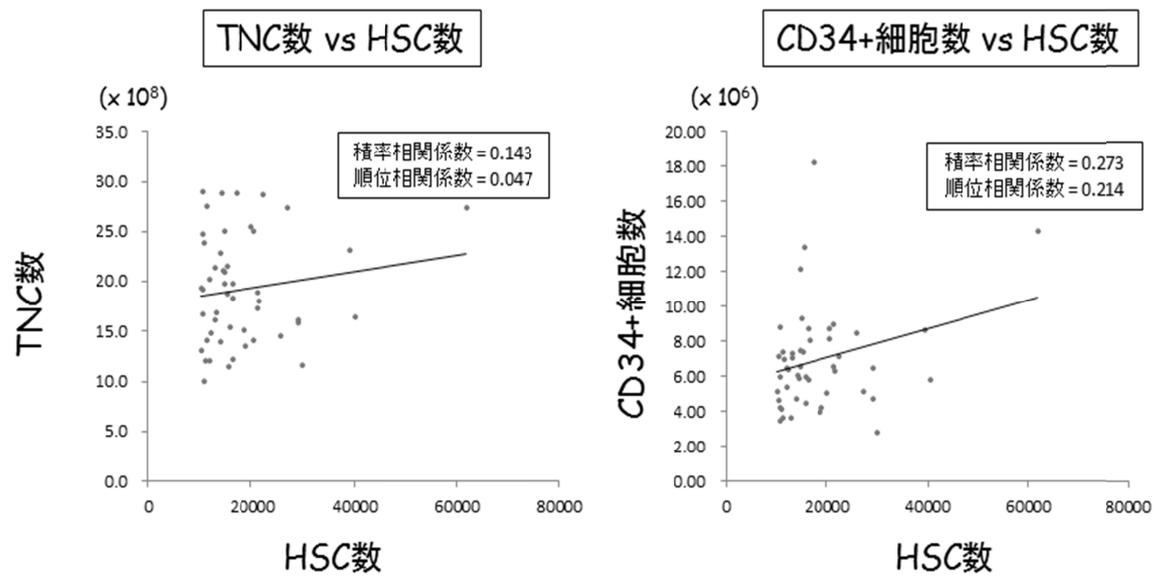
**(図3) HSC数とTNC数、CD34+細胞数との相関 (n=361)**



**(図4) HSC数とTNC数、CD34+細胞数との相関 (A群)(n=32)**



**(図5) HSC数とTNC数、CD34+細胞数との相関(B群)(n=280)**



**(図6) HSC数とTNC数、CD34+細胞数との相関(C群)(n=49)**

**(表1) 平成27年度に解析を行った移植用臍帯血(361本)の基本データ**

	TNC数 (x 10 <sup>8</sup> )	CD34+細胞数 (x 10 <sup>6</sup> )	HSC数
<b>平均 ± s.d.</b>	<b>15.7 ± 4.3</b>	<b>4.8 ± 2.1</b>	<b>5821 ± 6394</b>
<b>範囲</b>	<b>8.5 - 34.2</b>	<b>2.3 - 18.3</b>	<b>144 - 61866</b>
<b>中央値</b>	<b>14.8</b>	<b>4.2</b>	<b>3994</b>

**(表2) HSC数の多寡による移植用臍帯血(361本)の分類**

HSC数<1,000、1,000~10,000、>10,000で階層別にした際の基本データ

A. HSC数1000< (n = 32)	TNC数 (x 10 <sup>8</sup> )	CD34+細胞数 (x 10 <sup>6</sup> )	HSC数
平均 ± s.d.	14.1 ± 2.9	3.9 ± 1.2	636 ± 261
範囲	8.5 - 19.7	2.3 - 6.3	144 - 971
中央値	13.6	3.7	680

B. HSC数1000~10000 (n = 280)	TNC数 (x 10 <sup>8</sup> )	CD34+細胞数 (x 10 <sup>6</sup> )	HSC数
平均 ± s.d.	15.3 ± 4.0	4.6 ± 1.8	4271 ± 2287
範囲	9.0 - 34.2	2.5 - 12.4	1041 - 9737
中央値	14.5	4.0	3816

C. HSC数>10000 (n = 49)	TNC数 (x 10 <sup>8</sup> )	CD34+細胞数 (x 10 <sup>6</sup> )	HSC数
平均 ± s.d.	19.2 ± 5.4	6.9 ± 2.9	18061 ± 9556
範囲	10.1 - 29.1	2.9 - 18.3	10080 - 61866
中央値	18.9	6.5	15099



別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

該当事項なし。