

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 自己末梢血幹細胞移植における予測指標の検討

指導教官 平井 久丸先生

東京大学大学院医学系研究科

平成2年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 松原 麻理

1. 研究の背景と目的

同種骨髄移植が本格的に臨床応用された1970年以降、難治性血液疾患等に対する治療成績も飛躍的に伸びていったが、最近になると造血幹細胞収集源は必ずしも骨髄に求めずとも良いことが判ってきた。すなわち、ある条件下において造血幹細胞が末梢血からでも十分採取し得ること、さらに臍帯血にも豊富に存在することが明らかになり、これらの異なった起源の造血幹細胞を用いた移植治療が既に国内外にて行われ一定の成果を上げつつある。

1980年代後半に臨床応用が開始された自己末梢血幹細胞移植；auto-PBSCT (peripheral blood stem cells transplantation)は自家骨髄移植に比べ、移植後の造血回復が速やかで移植関連死率が低いことなどの利点から1990年代に入り急速に普及してきている。しかし移植に先立つ末梢血幹細胞採取において、未だ採取時期および量を予測する適切な指標がないという問題点が残っている。末梢血中CD34陽性細胞数が理想的な指標とされているものの、採取開始時期を即断をしなければならないこと、測定に必要なフローサイトメーターの再現性の問題等から実地臨床上活用が困難で、代わりに白血球数を幹

細胞の採取開始指標としている施設が多い。ただし白血球数を指標とした場合幹細胞量の予測までは困難なため、アフェレーシスを行っても目標値に届かないケースも多い。

本研究の目的は、PBSC(peripheral blood stem cells harvest)における末梢血幹細胞の産生能を、アフェレーシス開始以前に簡便に推測するシステムの確立である。そこで私は、特に PBSC 以前の末梢血血算データに着目し採取液 CD34 陽性細胞量との相関関係を統計解析することで、一般で日常的に行われている末梢血血算データから PBSC 採取の指標を導くことができるかを検討した。

一方、移植後の造血回復の速さは患者の生命予後を左右する大きな要因である。顆粒球数回復時間については移植される CD34 陽性細胞量と相関関係があるという見解でほぼ一致しているが、血小板数の回復時間については未だ統一の見解が得られていない。本研究ではこの血小板数回復時間の予測指標を検討するため、PBSC 採取液を用いた巨核球コロニーアッセイを行い、血小板数の回復までの時間との相関についても解析を行った。

2. 研究材料・方法

Ⅰ. 対象症例

東京大学医学部附属病院における自己末梢血幹細胞移植併用大量化学療法目的の症例 47 名。化学療法後の造血回復期に PBSC を動員、採取した症例全てとし、病名、治療歴、年齢等の違いは問わないものとした。

Ⅱ. 末梢血幹細胞採取（アフェレーシス）方法

無菌治療部、輸血部、主治医三者間合意のプロトコールにより、各疾患ごとの治療計画に基づいた化学療法後の造血機能回復期に(対象者に対しては G-CSF 併用投与)、PBSC が採取された。PBSC 採取は nadir 経過後、G-CSF 併用の場合末梢血白血球数が 5000 ないし 8000/ μ l まで回復した時点で、G-CSF 併用しない症例では末梢血白血球数が 1000/ μ l を超えた時点で開始され、原則として 2 日ないし 4 日間連日実施された。CD34 陽性細胞採取目標値は $1-2 \times 10^8$ /kgBW 以上とされた。

Ⅲ. 採取検体の評価

採取された末梢血単核球中の造血幹/前駆細胞の評価については、フローサイトメトリー法によって CD34 陽性細胞数が測定され、PBSC 採取数とされた。具体的には大塚アッセイ研究所に対し、PBSC 検体中 CD34 陽性細胞数の測定が依頼された。なお、検体使用にあたっては各症例とも文書にて同意を得た。

Ⅳ. 迅速・簡便な末梢血中造血幹細胞数モニター法の試み

以下に掲げた各指標および PBSC 検体中 CD34 陽性細胞数との相関を調べた。

- i) 単純白血球数；アフェレーシス施行当日早朝の白血球数。
- ii) 当日白血球数/前日白血球数；アフェレーシス時の白血球数の増加率を表わす指標と

して設定し、便宜上 β value>と名付けた。

iii) (当日白血球数/前日白血球数) x 当日白血球数 ; 白血球数の増加率に総白血球数を加味した指標で、便宜上 α value>と名付けた。

iv) Left Shift index (LS index) <末梢血白血球分画のスコアー化>

アフエーシス時の末梢血白血球分画において、左方移動の度合いが強いほど動員される CD34 陽性細胞数が多い、との仮説の元にスコアー化を試みた。すなわち、分画の成熟度により係数を決め、各分画百分比率 (%) に掛け合わせた値の総和を求め Left Shift index と名付けることとした。

また Left Shift index に関しては、ROC 曲線 : receiver operating characteristic curve 受診者動作特性曲線を描き、アフエーシス施行の是非に対する cut-off point の設定も試みた。

V. 巨核球コロニーアッセイ法

凍結保存された PBSC 検体を使い、rhTPO を加えたメチルセルロース半流動培地による巨核球コロニーアッセイ法を行った。

VI. PBSC 採取検体中の巨核球コロニー数との相関関係の有無について

以下に掲げた各指標との相関を調べた。

i) 単純血小板数 ; アフエーシス施行当日早朝の血小板数

ii) PBSC 検体中 CD34 陽性細胞数

iii) 移植後血小板数回復日数 ; PBSC 開始日を day0 とし血小板数が輸血なしに $50 \times 10^9 / \mu\text{L}$ 以上になるまでの日数

3. 結果

I. 対象症例

総症例数 47 例 (男 33 例, 女 14 例), 年齢中央値 39 (15-63) 歳であった。うち 33 症例は化学療法後 1 から 4 日目までのアフエーシスにて目標とする CD34 陽性細胞量が得られたが、14 症例は目標値に達しなかった。

II. アフエーシス開始以前に末梢血幹細胞の採取量を簡便に推測する方法

i) 単純白血球数 ; PBSC 検体中 CD34 陽性細胞数との間に相関関係はみられなかった。

ii) β value ; PBSC 検体中 CD34 陽性細胞数と正の弱い相関関係が認められた ($r=0.39$, $p<0.0001$)。各症例初日に限るとかなりの相関が認められた ($r=0.50$, $p=0.0001$)。

iii) α value ; PBSC 検体中 CD34 陽性細胞数と正の弱い相関関係が認められた ($r=0.31$, $p=0.0010$)。各症例初日に限るとかなりの相関が認められた ($r=0.52$, $p=0.0002$)。

iv) Left Shift index ; LS index 係数設定に関する検討の結果、各分画に対する係数は myeloblast;10, promyelocyte;8, myelocyte;6, metamyelocyte;4, stab;2, seg;0 が最適

と考えられ、CD34 陽性細胞数と正の強い相関関係が認められた ($r=0.77, p<0.0001$)。迅速な造血回復に必要とされる CD34 陽性細胞数 1 ないし $2 \times 10^6/\text{kgBW}$ を 1 日ないし 4 日で割った値である $0.25 \times 10^6, 0.5 \times 10^6, 1.0 \times 10^6/\text{kgBW}$ の 3 通りの値を、1 回のアフエレーシスにて採取される CD34 陽性細胞数の目標量として設定し ROC 曲線を描くと、いずれの採取目標値においても cut-off 値が $<50>$ となった。なお各目標値に対する cut-off 値での感度は各々 58.9%, 76.7%, 93.8%, 特異度は 95.7%, 100%, 93.5% であった。

III. PBSC 採取検体中の巨核球コロニー数の臨床的意義の検討

1) 巨核球コロニーの形成

rhTPO 希釈濃度系列アッセイでは $0 - 10 \text{ng/ml}$ の範囲で濃度依存性に CFU-MK 数および大きさが増加し 10ng/ml で plateau に達した。

2) PBSC 採取検体中巨核球コロニー数との相関関係の有無について

- i) 単純血小板数；相関は認められなかった。
- ii) PBSC 検体中 CD34 陽性細胞数；強い相関関係が認められた ($r=0.90, p<0.0001$)。
- iii) 移植後血小板数回復日数；強い相関関係が認められた ($r=-0.74, p=0.091$)。

4. 考察

本研究では迅速かつ簡便に末梢血中の造血幹細胞数を予測する方法の検討を行った。まず「アフエレーシス時の白血球数の増加率が大きいほど誘導される CD34 陽性細胞の割合が高い」という仮説を、 α value, β value という指標を用い検証した。さらに PBSC 液中 CD34 陽性細胞量は白血球分画と強い相関関係にある可能性に着目し、分画をスコア化した $<\text{Left Shift index}>$ という指標を提案した。 α value, β value も採取された CD34 陽性細胞数との弱い相関がみられたものの、LS index においては強い正の相関関係を示した。この LS index を用いることにより幹細胞採取量の予測が可能となり、さらに cut-off 値(今回の検討では 50)を設定することで簡便に採取時期および是非をも決定できるものと考えられる。これまで CD34 陽性細胞採取量を予測する簡便な指標は報告されておらず、本研究における LS index は臨床上極めて有用な指標となる可能性が強く示唆された。

また移植関連死にかかわる重大な原因の一つである血小板抑制からの回復に関しても、これまで定まった指標は報告されていない。本研究で行った巨核球コロニーアッセイは移植後血小板数回復時間と相関が認められ、移植患者の予後を予測する因子として臨床上有用となる可能性が示されたが、より適切な指標の設定は今後の課題である。