

〔国際学会印象記〕 ASHI 24th ANNUAL MEETING REPORT

Vancouver, British Columbia - October 10-15, 1998

丸屋 悦子

京都府赤十字血液センター，研究部

第24回American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) 学会が昨年(1997)の10月10日から15日の間、バンクーバー（カナダ）で開催された。会場はバンクーバー港に面したVancouver Trade & Convention Centerで、美しい港の眺めは朝、昼、晩とそれぞれの趣があり、厳しい学会スケジュール（朝、7時に会場オープン、ミーティングは8時から午後6時、日によっては午後7時から10時までにおよんだ。彼らのエネルギーの計り知れないものをいつもながら感じた）を十分癒してくれるものでした。また徒歩で行ける距離にあるスタンレーパークの紅葉の素晴らしさ（wonderfulの一言）、カナディアンギースの美しさ、キュートなリスの行動には目を奪われた。

今年のASHIが選んだRose Payne Distinguished Scientist AwardはDr. J. McMichael (the Head of the Molecular Immunology Group at the Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital, University of Oxford, England)で、先生はHLAとウイルス学に興味をいただき、T細胞を介したヒトのウイルス認識とそのHLA拘束性について世界ではじめてデータを出した科学者である。最近の仕事ではHLA-Eが提示するペプチドがHLA-class Iのシグナルシーケンス由来であり、これがNK cellによるkillingを防御していることを解明したことである。先生の講演の冒頭、イントロの部分で笹月先生の仕事が引用されていたことが印象深かった。

ASHI Scholars and International Scholar AwardではUtah Univ.のFrank Variが「HLA class II restriction in the binding of a library of HLA-B locus allopeptides

representing the B7 and B12 CREGS」のテーマで、Texas Univ.のRonald H. Kermanが「The Role of Flow Cytometry detected IgG and IgM anti-donor antibodies in cardiac allograft recipients」で、NHLF, Imperial College at Harefield Hospital, UKのJohn D Smithが「Increase in NFkB activity in endothelial cells induces by monoclonal and allospecific HLA antibodies」で、City Hospital, Belfast, N. IrelandのFionnuala Williamsが「HLA-A typing to allele level in different populations」で受賞し、それぞれのテーマでの講演があった。

今年のASHIで私がもっとも興味をもったテーマ「Cell Transplantation」について、以下3題の講演をレポートする。

1. Cord Blood Transplantation for Hematological Malignancies
Joan Kurtzberg, MD, Duke University Medical Center, Durham, NC
2. Allogeneic PBL Stem Cell Transplantation
Richard Champlain, MD, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX
3. Requirements for Allele Matching in Bone Marrow Transplantation
Effie Petersdorf, MD, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA

1. Cord Blood Transplantation for Hematological Malignancies
Joan Kurtzberg, MD, Duke University Medical Center,

筆頭筆者連絡先：〒605-0941 京都市東山区三十三間堂廻り町644
京都府赤十字血液センター研究部
丸屋 悦子

電話：075-531-0111
ファックス：075-541-9985

Durham, NC

私はDuke University Medical Centerの移植医です。小児におけるrelapse free survivalをHLA identical sibling間のBMTとchemotherapyで比較すると、生存率はBMTのほうがchemotherapyに比べ明らかに高く良い治療法ではあるが、すべての患者にBMTをするにはTable 1のような問題点がある。

Table 1. Barriers to BM Transplantation

- Donor availability
- Regimen related toxicity
- GvHD
- Graft Rejection/ Graft Failure
- Immunodeficiency/ dysregulation
- Relapse

1.1 Umbilical Cord Blood for Stem cell source

Stem cellのソースとしてCord Bloodが考えられたのは1980年代に、T. Boyseらによるネズミを使った実験にはじまり、ついでH. BroxmeyerらによりIn vitro studies、enriched progenitor cells、increased proliferation、more efficient gene transferなどについて研究がなされた。1980年代にUCBについてわかったことをまとめるとTable 2のようになる。

Table 2. Collection of UCB

- HPCs are immobilized throughout pregnancy.
- HPCs are present in UCB regardless of the route of delivery (e.g. vaginal vs. C. Section)
- Mobilization is not due to and effect of labor.

1.2 Related UCB Transplantation

1988年、UCB Transplantationで成功した第1例目の移植が行われた。このケースはファンコニー貧血の10才の男の子にその姉妹の臍帯血を移植した例で、10年後の現在も元気に生存している、とても良い例である。Related Cord Blood Transplantationの特徴について1995年のLancetに掲載されたWignerらの報告がある (Table 3)。子供に適用でき、白血球のrecoveryはBMTに比べ少し遅く、血小板の

recoveryは遅いが、GVHDは起こりにくいなどの特徴があげられる。

Table 3. Related Cord Blood Transplantation

- Engraftment feasible in children
- WBC recovery slightly delayed
- Platelet recovery delayed
- Less GvHD

重症Acute GVHDの発生頻度をHLA identical sibling間のBMTとHLA抗原が6/6または5/6適合のUCBとで比較した場合、BMTが 0.18 ± 0.08 (n=74) でUCBが 0.03 ± 0.02 (n=56) であった。さらに興味深いことに、haploidentical UCB transplantationにおけるGVHD発生をその不適合なhaplotypeが母由来であるか父由来であるかによりGVHD発生の強さに違いがあり、ミスマッチが母由来のhaplotypeのとき発生するGVHDの発生は0またはgrade 1と軽度 (Table 4) であり、なにか防御作用があるように思える。まだ例数も少ないので確かではないが今後も注目すべき現象である。

Table 4. Haploidentical UCB transplantation Risk of GVHD

	Disparity at NIMA#	Disparity at NIPA##
GVHD Grade 0 – I	10	1
GVHD Grade II – IV	0	4

: not inherited maternal haplotype
: not inherited paternal haplotype

1.3 Unrelated UCB Transplantation

Unrelated Cord Blood Banksは1992年ニューヨーク血液センターのDr. Rubinsteinらにより始められ、現在8,000以上の臍帯血が保存されている。1997年にDuke Univ. & American Red CrossとUCLAとGeorgetownの3施設で採取をはじめ、2001年までに15,000 unitsの臍帯血を採取する予定である。そのうちDukeでは7,500を採取する。Coordinating CenterとしてEMMESがある。

UCBのprocessingは次の3 stepからなる。

1. Volume reduction

2. RBC depletion
3. Cryopreservation Controlled rate vs.
Mechanical freezing
DMSO±HES

臍帯血の検査項目をtable 5.に示す。採取に必要な informed consentの方法をtable 6.に示す。

Table 5. Unrelated UCB Transplantation

Banking	
● Sterility	
● Cell count, HPC, Cd34	
● ABO/Rh	
● HLA	HLA-class I; serology, HLA-DR; DNA typing
● HEP	
● Viral Serologys (Mother)	IgG class
● CMV Cultures (Infant Saliva)	
● Family History	

Table 6. Banking of placental Blood

Informed Consent Process

Education

- Literature in new OB packed posters and video
- Talks at Lamaze classes
- Consenting session with collection nurse
- Reaffirmation of consent after delivery

Major points of consenting process

- Donation is voluntary
- No guarantees that unit will be collected
banked or present if requested for use by
donor's family
- Maternal blood sample (feedback of
positive serology results)
- Preview of mother and baby's charts
- Confidentiality

1.4 UCBの移植成績

最近の5年間に165の移植がDuke Univ.と Minnesota Univ.で行われ、移植後6ヶ月以上追跡ができた患者が90人になる。このうち143例の移植に

ついて、患者の病名をTable 7に、Table 8に移植された患者と臍帯血についての情報を、Table 9に移植センターであるDukeとMinnesotaの移植条件の違いを、そしてTable 10にHLAの適合度を示す。

Table 7. Unrelated UCB Transplants

Duke Univ. and Univ. of Minnesota

Diagnosis	Total (n=143)
● Malignant disease	97 (68%)
ALL	48 (34%)
ANLL	35 (22%)
CML	6 (4%)
JCML	3 (2%)
CLL	1 (1%)
NHL	2 (1%)
Neuroblastoma	2 (1%)
● Non-malignant disease	46 (32%)
SAA/FA	13 (9%)
BD/Osteopetrosis	5 (3%)
MDS (Refractory Anemia)	4 (3%)
Immune deficiency	8 (6%)
Metabolic disorder	16 (11%)

Table 8. UCB Transplantation— 4/98

Duke/ Minn.

Characteristics of Recipients

● Recipient age (years)	
Median (range)	7.2 (0.2- 58)
● Recipient weight (Kg)	
Median (range)	21.6 (4.8-92)
● Recipient of sex	
Male / Female	89(62%) / 54(38%)
● Recipient's CMV serostatus	
Negative / Positive / Missing	68 (48%) / 69 (48%) / 5 (4%)

Characteristics of UCB Grafts

● Volume of UCB collected (ml)	
Median (range)	84 (40-214)
● Cell doses ($\times 10^7/\text{kg}$)	
Median (range)	3.6 (0.7-33.8)

- CD34 dose ($\times 10^5/\text{kg}$)
Median (range) 7.6 (0.2-105)
- CFU-GM dose ($\times 10^4/\text{kg}$)
Median (rang) 1.3 (0.1-89.1)
- CD3 dose ($\times 10^6/\text{kg}$)
Median (rang) 9.0 (0.0-101)

Table 9. UCB transplantation Duke/ Minnesota Differences

	Duke	MN
G-CSF	+	—
TBI	+/-	+
Steroids	High	Low Dose
HLA disparity	3/6 +	5/6 +
Adults	+	—
Chemotherapy	Mel	Cy

Table 10. Duke/Minnesota UCB transplantation 4/98

Degree of HLA Match	Number
6/6	15 (10%)
5/6	47 (33%)
4/6	61 (43%)
3/6	9 (6%)
2/6	2 (1%)
not available*	9 (6%)

*DRB1 assignment was not available

HLA typing grade: Serology for HLA-class I (A, B)

High resolution typing for HLA-DRB1

(The results of Unrelated UCB Transplantation at Duke and Minnesota Univ.)

- Neutrophileのengraftmentについて、 $\text{ANC} \geq 5 \times 10^8/\text{L}$ になるMedianは 25日 (Range: 10-59 days) であり、HLAの不適合度は影響を与えず、CD34陽性の移植細胞数が >16 の群と <3 ($\times 10^5/\text{kg}$)の群を比較すると >16 の群が早期の生着がみられ、 $p < 0.01$ で有意差があった。複数の要因を総合して解析した結果をTable 11に示す。最も重要な因子は移植されるCD34陽性細胞の数であることが分かった。

Graft failureの各疾患別発生率をTable 12に示す。

Table 11. Multiply Regression Analysis

	Relative Risk	p value
CD34 dose ($\times 10^5$)	1.04 (1.02-1.06)	<0.01
GFU-GM ($\times 10^4$)	1.2 (1.1-1.06)	<0.05
Recipient weight	1.01 (1.00-1.03)	0.05
HLA match		
6/6 and 5/6	1.0	
2/6 and 3/6	1.4 (0.6-1.6)	0.17

Table 12. Graft failures of Unrelated UCB Transplantation

Graft failures	9 /145 (6%)
Diagnosis	number of patients
CML	3 (38%)
SAA	1 (12.5%)
FA	2 (25%)
ALL (no ATG)	1 (12.5%)
ANLL	2 (25%)

- Platelet engraftmentについては、 $\text{PLT} \geq 5 \times 10^{10}/\text{L}$ となるに要する日数は中央値で 2.7 months (Range 1-8 months) であった。また Neutrophileの場合と同様にHLAの不適合度は影響を与えず、CD34陽性の移植細胞数が >16 の群と <3 ($\times 10^5/\text{kg}$)の群を比較すると >16 の群が早期の生着を示し、 $p < 0.01$ で有意であった。
- GVHDについて、Acute GVHDの発生率はgrade II-IVが 0.37 (0.29 - 0.45)、grade III-IVが 0.14 (0.08 - 0.20)であり、HLAの適合度とGVHD発生率とはgrade II-IVのGVHDともgrade III-IVのGVHDとも相関はみられなかった。Chronic GVHD (Limited and Extensive) の発生率は 0.11 (0.02 - 0.20)であった。
- Relapse率は0.25 (0.12 - 0.38)であった。
- Survivalは0.44 (0.35-0.53)で、HLAの不適合率とは相関がみられなかった。患者の年齢について < 2 years ($n=32$)、2-17 years ($n=85$)、 > 18 years ($n=26$)の3群で比較すると < 2 years ($n=32$)は他の群に比べ良いsurvival(0.8)であっ

た ($p=0.01$)。移植されたCD34陽性細胞数のDose ($\times 10^5/\text{kg}$) を4群 (≥ 18 ; $n=30$, 7-17; $n=34$, 3-6; $n=32$, < 3 ; $n=26$) に分け、そのsurvivalを比較すると ≥ 18 (0.6) の群と < 3 (0.2)の群の間に有意差 ($p < 0.01$) がみられた。

● Non-relapse Mortalityについて、

- ✓ 移植CD34陽性細胞数 ($\times 10^5/\text{kg}$) を4群 (≥ 18 ; $n=30$, 7-17; $n=34$, 3-6; $n=32$, < 3 ; $n=26$) に分け、相関を調べると < 3 の群 (0.8) では他の群(ほぼ0.5)に比べ明らかに高かった ($p < 0.01$)。
- ✓ Grade II-IVのacute GVHD発生率とその予防薬 (Low dose methylprednisone; $n=71$, high dose methylprednisone; $n=52$, other; $n=20$) の違いについて相関はなかったが、予防薬の違いとMortalityについてはhigh dose methylprednisone群のほうがlow dose群に比べ2倍高いmortalityを示した ($p=0.09$)。
- ✓ その他影響を与える因子として感染があげられる。この原因として以下のような因子が疑われる。

?: Delayed neutrophil recovery

?: Lower neutrophil load

?: Neutrophil defect or immaturity

?: Delayed immune reconstitution

つぎにumbilical cordのexpansion systemについて述べる。我々はクローズドシステムで行えるAstrom cell production systemを用いCord Bloodのexpansionを行っている。実際の移植にはまずcord bloodの一部を移植し、残りをAstrom cell production systemで増殖させ、12日後に再度移植をおこなう。このようなEx vivo expansionによるUCB transplantationにより1998年のsurvivalが他の年に移植したsurvivalと比較して最も良い結果 (0.8) が得られているが、今後どのようなようになるかは解らない。

1.5 Haplo-related UCB Transplants

4人の患者 (年齢2~5才) にhaplo-related UCB transplantsを行った結果について話す。患者の性別

は男性2名、女性2名で疾患はAMT; 2、BDA; 1、FA; 1であった。ドナーは3人がsiblingで1人が27weeksのtwinsのpool UCBである。移植したcell doseは1, 2, 5, $8 \times 10^7/\text{kg}$ である。移植結果は3/4が生着し1例 (5才のFA) がgraft failureであった。副作用は1人が移植7ヶ月後に一過性のITP/AHAになった。このような結果からhaplo-related UCB transplantsについて今のところ以下のようにまとめられる。

- non acute or chronic GVHD
- Full donor hematopoietic
- Normal immune function
- Event free survival 1-3 years

1.6 Discussion

Dr. Rubinsteinよりのコメント：今回のUCB TransplantsについてのDuke/Minnesotaのデータで、我々のデータとの相違はHLAに関することである。我々のHLA matchingの仕方とあなた方のmatchingの仕方には違いがある。例えば、あなた方が6/6 matchとするものでも我々のmatching法ではmismatchとなる。HLAのmatchingを統一して解析する必要がある。我々のデータでは移植成績に影響を及ぼす因子はCD34細胞数とHLAの適合度であった。

2. Allogeneic PBL Stem Cell Transplantation

Richard Champlain, MD, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX

2.1 Stem cellとそのSource

Stem cellについてTable 13のようにまとめることができる。stem cellを採取する方法として骨髓液を採取する方法があるが、スライドのように、ドナーに麻酔をかけ、骨盤の両側 (右・左) に百回づつ穴をあけ採取するのである。これはドナーも採取する側も非常に疲れる。一方、末梢血からstem cellを採取するのは次のスライドのごとく、フェレーシスで白血球を採取する簡単な方法でドナーの負担も少なくてすむ。またG-CSFをドナーに前もって投与することによりstem cellを誘導し一回のフェレーシスで移植

Table 13. Stem Cell

- Primitive hematopoietics cells capable of self renewal as well as differentiation into mature progeny
- Capable of restoring lymphohematopoietic reconstitution after myeloablative therapy
- Found in bone marrow, peripheral blood, cord blood, fetal liver

に必要な量を採取することができる（この薬を使用するまでは採取に2週間を必要としていた）。

1993年から1996年の間に行われた同種移植で stem cellの由来を調べた（Table 14）。1993年ではほとんどの移植が骨髄を使用していたが、1996年ではallo PBPC (Peripheral Blood Pheresis Cell) が22%も行われるようになった。rG-CSFの連続投与による stem cell (CD34 positive, CD34 positive and Thy dim positive)の増加を調べると、はじめの2～3日は増加がみられないが、5日目でピークを示す。我々は stem cellのマーカーとしてCD34をここ10年あまり用いてきた、試みにCD34 negative細胞を用い血液細胞の再構築を調べたが、CD34 positiveに比べ、再構築されるのが遅延したため、CD34を stem cellの良いマーカーとして今も用いている。G-CSFの連続投与による各細胞の増加率をTable 15に示す。白血球は6倍で、血小板は増加せず、CD34 positive細胞は16倍になり、移植可能な量が確保できる。

Table 14. Source of stem cell for allogeneic transplant

(1993-1996)		
1993	bone marrow	99%
	peripheral blood	0.5%
	umbilical cord blood	0.2%
1994	bone marrow	97%
	peripheral blood	3%
	umbilical cord blood	0.5%
1995	bone marrow	86%
	peripheral blood	13%
	umbilical cord blood	2%
1996	bone marrow	75%
	peripheral blood	22%
	umbilical cord blood	3%

Table 15. PB cell concentrations over pre-treatment level
after 3 days of G-CSF treatment

fold increase over baseline		
WBC	6.4*	n=41
PMN	8.0	n=41
Lympho	2.2	n=41
Platelets	1.0	n=41
CD34+	16.3	n=10
CD34+Thy-1 ^{dim}	24.2	n=10
CD34+Thy-1 ^{dim} 38 ⁻	23.2	n=10

*: mean

2.2 PBPCの問題点

Allo-PBPCで問題になるポイントのひとつとして、混入しているT細胞によるGVHDである。Table 16はフェレーシスで採取した末梢幹細胞溶液の中にリンパ系の細胞がどれくらい混入しているかを調べた結果である。この問題については後に述べる。

Table 16. Lymphoid subset collection by apheresis from 20 normal HLA-identical relatives

apheresis cell/kg recipient			
CD3	×10 ⁶	438	(104-1040)
CD4	×10 ⁶	301	(100-663)
CD8	×10 ⁶	149	(22-402)
CD19	×10 ⁶	88	(35-143)
CD56+CD3-	×10 ⁶	79	(52-193)

次の問題点は最低限移植に必要な細胞数である。Table 17に今まで行ったallo-PBPCで最小のCD34陽性細胞数の移植成績を示した。2.5×10⁶でも生着には問題がなかった。もっともほとんどのPBPCは多くの細胞数が確保できる。

同種PBPCのドナーについてTable 18にあげた項目について考慮している項目である。その中で

ドナーとしての適格性について、Table 19に具体的に示す。PBPCドナーの中で、重篤な副作用を起こした例を紹介する。

『Case Report』

- 22 yr male, donor for cousin (AML)
- 6 days G-CSF at 10 micrograms/Kg/day
- Pneumothorax after removal of pheresis catheter

- Spontaneous splenic rupture 2 days later
- Mild ARDS

このような例を2例経験している。

次にG-CSF投与による副作用をまとめるとTable 20のようになる。最も多発するのが骨痛で次に頭痛や無痛覚症であった。

Table 17. Lowest CD34+ grafting doses and engraftment after allo-PBSC transplantation

CD34 cells /kg transfused	ANC >0.5	ANC >0.1	PLT >20	PLT >50	FU days	RFLP
1. 2.5×10^6	10	10	11	13	88	ND
2. 3.3×10^6	9	10	16	19	87	ND
3. 3.9×10^6	9	9	12	18	200	100%
4. 3.9×10^6	11	12	14	19	85	ND

Table 18 . Allogeneic PBPC Donors

- ligibility/ Exclusion----- Donor and Recipient consideration
- Risks of mobilization with G-CSF and collection by apheresis
- Practice guidelines for donor management
- Monitoring----short and long term effects
- Registry for adverse effect

Table 19. Allogeneic PBPC Donor Eligibility

- Same as platelet donor with exception
- Vascular Access-try to avoid central catheter
- Age: pediatric and elderly
- Infections: Hepatitis B and C seropositivity may be acceptable
- ? Exclusion for donor safety
 - Bleeding/clotting disease, cardiovascular disease, auto immune /inflammatory disorder, pregnancy
 - ? Strong family history of leukemia

Table 20. Filgrastim-related adverse events

Adverse Events	day 4 group (n=44)	day 6 group (n=30)	pvalue
Bone pain	36(81)	27(90)	0.5
Headache	33(75)	20(67)	0.44
Nausea	5(11)	3(10)	0.99
Fatigue	11(25)	16(53)	0.01
Grade 2-3 toxicity*	27(61)	18(60)	0.99
Analgesics	29(65)	25(83)	0.11

*: NCI CTC

2.3 PBPCのコスト

同種幹細胞移植でBMTとPBPC移植にかかる費用を比較した (Table 21)。PBPCはBMTとほぼ同じくらいかまたはそれより安価で移植できる。

Table 21. The comparison of charge between Apheresis and BM

	Apheresis	Marrow
Misc	55	1081
Surgery	0	2022
Pharmacy	1907	365
Laboratory	3483	2508
Radiology	115	109
Clinic	182	212
Pro Fee	3416	6090
Cell Lab	3881	2362
Total	1439	1513

2.4 PBPCによる移植成績

(Neutrophil recovery)

PBPCとBMTのneutrophileの回復を比べるとほと

んど差は見られず、PBPCのほうが若干早く100% recoveryを示す。

(Platelets recovery)

Plateletsの回復はPBPCのほうがBMTに比べ早く回復した。

(Advanced LeukemiaにおけるBMTとPBPCの比較)

Table 22にadvanced LeukemiaにおけるBMTとPBPCによる移植成績を比較する。

Table 22. Results with allogeneic PBPC

	Advanced Leukemia		
	BMT CSA/MTx	BMT CSA/MP	PBPC CSA/MP
N	30	19	25
Granulocytes > 0.5	16	9	10
Platelets > 50	32	25	18
Grade 2-4 RRT	90%	84%	40%
Grade 2-4 GVHD	49%	63%	42%
Discharged	33	20	16
Day 180 survival	53%	32%	72%

顆粒球や血小板の回復は前述のとおりで、心配していたGVHD発生頻度の上昇（PBPCではT細胞がBMTに比べ多く移植されることに由来する）は見られなかった。さらに驚いたことに、regimen related toxicity (RRT) がBMTに比べ明らかに低かった。したがってPBPCはtoxicityもGVHD発生も低かった。しかしchronic GVHDの発生頻度を調べると74%（BMTの場合は30%）に発生していた。この原因はまだ不明である。

2.5 HLA-identical sibling間移植でPBPC移植とBMTの比較

ヨーロッパの移植グループの協力により、PBPCとBMTでの移植成績を移植後1年後の成績で比較した。Table 23に患者の情報と移植成績をacute leukemiaとCMLについてまとめた。比較した移植例はPBPCが288例とBMTが536例である。移植成績は患者の疾患別（acute leukemiaとCMLで20才以上）に比較した。

Acute leukemiaの場合、差がみられたのは

mortalityでPBPCがBMTより低く、良い成績であった。ただしchronic GVHDの発生頻度はBMTに比べ高かった（70% vs. 40%）。全体的な成績はどちらも変わりなかった。

CMLの場合、患者がCPで移植を受けた場合mortalityも disease free survivalも両移植法で変わりはないが、患者がAPで移植を受けた場合PBPCのほうが明らかに死亡率も低くdisease free survivalも高かった。

このような結果から、PBPCは年齢の高い患者（70才まで）や虚弱な患者に強い化学療法（毒性も強くなる）を行うことなく、GVL効果により疾患を治療することができる。例えば以下のような方法で利用できる。

Induction of GVL as primary therapy

Nonablative
Preparative
Regimen to → Allo
Achieve PBPC → Short
Engraftment or BMT GVHD → DLT
Prophylaxis

Eligibility: Elderly (up to age 70) or medically infirm patients; potential alternative to ablative regimen in younger patients with indolent diseases.

Table 23. Peripheral Blood Progenitor Cell(PBPC) versus Bone Marrow (BM) Transplants from HLA-identical siblings for Leukemia
-Outcome in First Posttransplant Year (1995-1996)-

[Patients]

- 288 recipient of PBPC transplants
- 536 recipient of BM transplants
- Reported by 105 teams
- North America (N=270)
- Europe (N=378)
- South America (N=62)
- Australia /NZ (N=34)
- Asia (N=80)

[Results]

● Acute Leukemia

◆ Granulocyte (ANC)

	Median
PBPC	14 days (N=131)
BM	18 days (N=230)
(Patients age $\geq$ 20y)	

◆ Acute GCHD

PBPC	40% (N=125)
BM	40% (N=217)

◆ Chronic GVHD

PBPC	70% (N=108)
BM	40% (N=185)

◆ Overall outcome:

No difference between PBPC (N=129) and BM (N=270)

◆ Mortality

PBPC	20% (N=159)
BM	40% (N=258)

◆ Disease free survival

PBPC	70% (N=159)
BM	60% (N=258)

● CML

◆ Mortality

CP; PBPC	30% (N=129)
BM	30% (N=245)
AP; PBPC	20% (N=201)
BM	70% (N=33)

◆ Disease free survival

CP; PBPC	60% (N=101)
BM	70% (N=245)
AP; PBPC	60% (N=20)
BM	30% (N=33)

このような結果からHLA identical sibling間の同種PBPCについて、Table 24のようにまとめられる。+はメリットと考えられる特徴で-はデメリットである。Survivalについては長期の観察が必要であり、現時点では評価できない (Thank you)。

Table 24. Allogeneic PBPC vs. BM

HLA matched Sibling

- - Requires G-CSF mobilization of donor
- + Higher CD34 dose

- +- Higher T-cell dose
- + Rapid hematological recovery
- + Lower RRT, early morbidity
- +- No change acute GVHD
- - Higher rate chronic GVHD
- + Greater GVL (?)
- ? Survival

2.6 Discussion

- Stem cell移植の方法として、BMT、UBCT、PBPCがあるが、血縁間や非血縁間の移植で、HLAが完全マッチでない場合はどの方法を用いばいいのですか？

<答え>

この質問はいろいろな意味を含んだ、良い質問です。アメリカでは stem cell 移植にほとんど BMT が用いられ、最近臍帯血移植や PBPC が行われるようになった。ヨーロッパではPBPCが主に用いられている。非血縁間の移植でHLAにミスマッチがある場合、PBPCにより造血幹細胞は大量に得られるが、同時に免疫反応細胞も大量に移植されることになるため、重篤な GVHD 発生が考えられる。我々はまず血縁間でデータを得、次に非血縁間でその適用法を考えたいと思っている。例えば、大量のCD34陽性細胞を含む血液から、免疫反応細胞を除いて移植する方法などです。今後、国際的な協力下で検討する必要があると思います。

3. Requirements for Allele Matching in Bone Marrow Transplantation

Effie Petersdorf, MD, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA

3.1 GVHD発生のハイリスクファクター

シアトル、フレッドハッチンソンで行われた血縁間骨髄移植でGVHD発生とHLAの適合度との関係を調べた。その結果、HLAの不適合数がGVHDのリスクファクターであることが解った。ではどのlocusの不適合がもっとも強いGVHDのリスクファクターになるかを調べると、HLA class IIであることが解った。次に非血縁と血縁間骨髄移植でのGVHD発生頻度を比較した。HLA-A, B, DRが血清学的検

査で適合している場合、CMLの患者でCP期に移植を受けた症例のⅢ～Ⅳ度のGVHDを起こした頻度 (matched sibling; 17% {90/526} , unrelated; 38% {69/182}) を比べると、明らかに非血縁間ではGVHDの発生頻度が高かった。

3.2 HLA typing 技術の進歩とその多型性

このようなデータが得られた頃、我々はHLA抗原がタイピング法でより多型性が高くなることを知った。例えばTable 25に示すようにHLA-DRとDQ抗原のタイピングについて、血清学でbroadな特異性の血清を用いたタイピングでDR5抗原を保有する場合、より多くのより特異的な抗血清を用いてタイピングするとDR5抗原の中にDR11とDR12抗原を保

有する細胞があることが解った。1975年、この細胞 (DR11) をHTCを用いたMLC法でタイピングを行うと、DR11の中にDw5とDwJVMという2種類の抗原を保有する細胞があることが解った。その後DNA typingが可能になり、このDw5を保有する細胞がDRB1*1101とDRB1*1104のように分類されることが解った。このようにHLA抗原がさらに多型性に富むことがHLA typing技術の進歩とともにわかってきた。

非血縁間骨髄移植でのHLA-DRB1 & DQB1の適合性とGVHD—

1992年、我々はDNA typingを用い、CMLの患者にCP期で非血縁間骨髄移植を行った症例につき、

Table 25. Typing for HLA-DR and DQ

Technique	Specificity	Example
Serology	broad	DR5 vs. DR4
Serology	private	DR11 vs. DR12
HTC	> <	Dw5 vs. DwJVM
DNA-SSOP	Allelic	DRB1*1101 vs. DRB1*1104

Table 2.

HLA-A, B, DR Serologic Matches (1996)				
(n=449)				
DRB1 Matched (n=376)		DRB1 Mismatched (n=73)		
DQB1 Matched (n=335) Group 1	DQB1 Mismatched (n=41) Group 2	DQB1 Matched (n=48) Group 3	DQB1 Mismatched (n=25) Group 4	
Ⅲ～Ⅳ	125	23	24	15
aGVHD	37%	56%	50%	60%

血清学的タイピングでHLA-A, B, DRが一致している症例で、DRB1 alleleの適合度とⅢ～Ⅳ度のGVHD発生頻度の関係を調べた。GVHDの予防薬はMTXとCSPを用いた。DRB1 allele match群 (127/306, 41%) とDRB1 mismatch群 (38/59, 64%) の間に $p < 0.01$ で有意な差が見られた。その当時我々はDR以外のHLA class II抗原 (HLA-DQ) のmismatchについて、おそらく連鎖不平衡があるため不適合は少ないと考えていた。

1996年、我々は今までに行ったHLA-A, B, DRが血清学的タイピングで一致している非血縁間骨髄移植449組について、HLA-class IIの適合度を調べた (Table 26.)。次の4群に分類された。① HLADRB1 alleleとDQB1 allele match群 (335) ② HLA-DRB1 allele matchでHLA-DQB1 allele mismatch群 (41) ③

HLA-DRB1 mismatchでHLA-DQB1 allele match群 (48) ④ HLA-DRB1 mismatchでHLA-DQB1 mismatch群 (25)。

各群でⅢ～Ⅳ度のGVHD発生率を比べると、①群が37% (125/335)、②群が56% (23/41)、③群が50% (24/48)、④群が60% (15/25) となった。HLA-DQB1のアミノ酸レベルのミスマッチ数はHLA-DRB1 allele間 (例えばHLA-DRB1*0401とHLA-DRB1*0402) のミスマッチ数よりはるかに多くのアミノ酸不適合がある。HLA-DQの適合性もGVHDのリスクファクターになり、移植前のHLA-DR, DQ allele typingの必要性が解った。

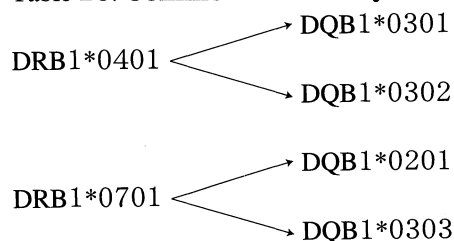
HLA抗原の重要な特徴、人種によるallele頻度の偏りと連鎖不平衡—

では次にこれらのローカスのミスマッチを詳しく調べる。Table 27に非血縁間骨髄移植を行ったNorth American Caucasian (n=364) のHLA-DRB1 allele頻度とmismatchの数を示した。North American Caucasianの患者の抗原頻度はnormal集団とほぼ同じであるが、ここで注目すべきことは、ミスマッチの抗原に偏りがあることである。すなわち多くのミスマッチがDR4とDR11に起こっている。抗原頻度としてDR3は高いが、ミスマッチは0であった。DQについては連鎖不平衡に起因するミスマッチがみられた (Table 28)。すなわち、HLA-DRB1*0401を保有するハプロタイプにHLA-DQB1がDQB1*0301であるハプロタイプとDQB1*0302であるハプロタイプがある。同様にHLA-DRB1*0701の場合もDQB1*0201とDQB1*0303を保有する2種類のハプロタイプがあり、DRB1が適合でDQB1のミスマッチが起こっている。DQB1のミスマッチのほとんどがこのようなケースであった。

Table 27. HLA-DRB1 Mismatches in HLA-A, B, DR serologically matched Unrelated Marrow Transplants (n=364, North America Caucasian)

	Frequency in study population		Number of allele mismatched	
DR1	80	(10.9%)	4	(5.0%)
DR15 (2)	109	(15%)	3	(2.5%)
DR16 (2)	3	(0.5%)	1	(33.3%)
DR3	138	(19.0%)	0	
DR4	114	(15.7%)	18	(15.7%)
DR11	65	(8.9%)	20	(30.8%)
DR12	1	(0.1%)	0	
DR13	67	(9.2%)	10	(14.9%)
DR14	24	(3.3%)	4	(16.6%)
DR7	107	(14.7%)	0	
DR8	13	(1.8%)	3	(23.1%)
DR9	4	(0.5%)	0	
DR10	3	(0.4%)	0	
	728	(100%)	63	

Table 28. Common DRB1-DQB1 Association



非血縁間骨髄移植でのHLA-class I allele mismatchと移植成績の関係—

スチーブンマーシュによりまとめられた1998年10月でのHLA抗原の多型性数をTable 29に示す。ここで、注目したいことはHLA-class Iにも400以上の多型性があることである。このことから以下のような仮説を立て、その検証を行った。

Hypothesis

Donor-recipient disparity for HLA-A, B and C alleles accounts for the increased risks of acute GVHD, graft failure and mortality in unrelated stem cell transplantation

実験計画をTable 30に示す。HLA typing methodは移植ペアのHLA-A, B, C alleleのシーケンスを行った。統計的処理法として、GVHDの発生頻度はカウント法で、生存率はKaplan-Meier法を用いた。Table

31にHLA-A, Bが血清学で適合し、HLA-DRB1とDQB1 alleleが適合している非血縁間骨髄移植（64ペア）でHLA-A, B, C alleleの不適合ペアの数とその組み合わせを示す。主なミスマッチはHLA-Cで起こっていた。次にHLA-class IとIIのミスマッチの組み合わせで不適合があった非血縁間移植ペア65組の内訳をTable 32に示す。Table 33にシーケンスによるタイピングを行った300ペアの組織適合性抗原の適合度を示す。Table 34にHLA-class Iでのミス

Table 29. HLA Diversity

HLA Nomenclature Committees			
October 1998			
Class I Antigens		Class II Antigens	
HLA-A	120	HLA-DRB	260
HLA-B	250	HLA-DQA1	19
HLA-C	70	HLA-DQB1	36
HLA-E	5	HLA-DPA1	15
HLA-G	14	HLA-DPB1	84
	459	DMA	4
		DMB	5
			425

Table 30. Study Design

- 300 patients transplanted from unrelated donors for CML CP1, CP2, AP
- Conditioning Regimen: CY-TBI
- T-replete Done marrow
- GVHD Prophylaxis: CSP-MTX
- Clinical Endpoint: graft failure, GVHD, survival

Table 31. Class I allele Mismatches Among

HLA-A, B, DRB1, DQB1 Identical	
Unrelated Donor Transplants (n= 64 pairs)	
Mismatch	n
HLA-A only	13
HLA-B only	9
HLA-C only	26
HLA-A and B	0
HLA-A and C	3
HLA-B and C	9
HLA-A, B and C	4
	64

Table 32. Class I and II Mismatches among Unrelated Donor Transplants (n=65 pairs)

Class II mismatch	class I mismatch	n
HLA-DRB1	None	9
n=20	HLA-A only	0
	HLA-B only	2
	HLA-C only	1
	Combination	8
HLA-DQB1	None	16
n=31	HLA-A only	0
	HLA-B only	2
	HLA-C only	7
	Combination	6
Both	None	6
n=14	HLA-A only	0
	HLA-B only	0
	HLA-C only	2
	Combination	6
		65

Table 33.

Histocompatibility Matching	
Allele matching	142 (47%)
Single class I	55 (18%)
Multiple class I	35 (12%)
Single class II	24 (8%)
Multiple class II	7 (2%)
Class I and II	37 (12%)
	300

マッチアリの組み合わせとその数を示す。

HLA-A locusではHLA-A2 alleleのミスマッチが主で、HLA-A26 alleleにはミスマッチが無かった。HLA-B locusではHLA-B35とB44 alleleで起こっていた。HLA-C locusについては抗原間のミスマッチ（例えば0102/02022）も起こっていた。

〈Graft Failure〉

Graft FailureとHLA allele適合度との関係を調べた結果をTable 35に示す。Allele matchとHLA-class I

single mismatchのgraft failure率は変わらなかったが、HLA-class I multiple mismatch（例えばHLA-AとBやHLA-AとCに不適合がある場合）ではgraft failure率が最も高かった（29%）。そしてHLA-class IIの不適合はgraft failureにはおそらく影響を及ぼさないと考えられる。

〈Acute GVHD Ⅲ～Ⅳ〉

Acute GVHDとHLA allele適合度との関係をみると、HLA-allele match群とHLA-class I single mismatch

Table 34. Mismatch of HLA-A , B, C alleles

HLA-A	Number	HLA-B	Number	HLA-C	Number
0201/0225	1	1401/1402	3	0102/02022	8
0201/0205	8	1501/1507	1	0401/1203	6
0201/0206	2	1501/1518	0	0303/0304	5
0201/0207	0	2702/2705	3	1402/1502	4
0201/0210	0	2705/2709	1	0202/1502	3
0201/0211	2	3501/3502	1	0304/0702	3
0206/0210	0	3501/3503	10	0501/0701	3
0301/0302	4	3501/3508	1	0501/1601	3
2402/2403	2	3502/3503	2	0701/0702	3
2402/2407	1	3502/3505	1	0701/1203	3
2601/6601	1	3502/3508	2		41/93
2601/2602	0	3503/3508	1		
2601/2603	0	3508/35 new	1		
2602/2603	0	3901/39062	4		
2901/2902	3	3902/3904	0		
3001/3002	4	4002/4011	1		
3301/3302	4	4002/4003	0		
6801/6802	2	4002/4006	1		
	32	4003/4006	0		
		4402/4403	11		
		4402/4405	3		
		4403/4405	3		
		5101/5103	1		
		5101/5108	1		
		5501/5502	1		
		2702/270517	1		
		0702/07new	1		
			55		

群は同程度のa-GVHD発生頻度（約40%）で次が高いのがHLA-class Iのmultiple mismatch群（約50%）で、最も高い群がHLA-class II single mismatch群とHLA-class Iとclass II両方のmismatch群（約60%）であった。Table 36にGVHDについてproportional Hazard Regression Modelの結果を示す。GVHDのリスクファクターとしてHLA-class IIの適合性が重要であることが解る。

〈Survival〉

生存率との関係を調べると、HLA allele match群とsingle class Iまたはclass II mismatch群の生存率はほぼ同じで、HLA-class I multiple mismatch群とclass

Table35. Graft Failure

HVG

Donor Disparity	Number of Pair	Graft Failure (%)
Allele Match	146	3(2)
Single class I	50	1(2)
Multiple class I	31	9(29)
Single class II	24	0
Multiple class II	7	0
Class I and class II	34	4(12)

Table 36. Grade III-IV Acute GVHD

Proportional Hazards Regression Model*

Disparity +	Number of pairs	Hazard Ratio (95% CI)	p value
Allele Match	142	1.0(-)	
Single class I	54	1.1(0.7-1.0)	0.66
Multiple class I	34	1.4(0.8-2.6)	0.27
Single class II	24	1.8(1.0-3.4)	0.06
Class I and class II	35	2.0(1.1-3.4)	0.02

*: Adjusted for stage of disease, body weight index, time interval from diagnosis to transplant, pretransplant interferon therapy.

+: Seven patients had multiple class II mismatches, and 5 developed grade III-IV acute GVHD.

Iとclass II 両方のmismatch群が悪い結果が得られた。Table 37にその結果をまとめる。生存率のリスクファクターはHLA-class Iのmultiple mismatchやHLA-class Iとclass IIのcombination mismatchである。いままでの結果をまとめると以下になる。

3.3 Summary

Unrelated Stem Cell Transplantation for CML

- HLA class I allele disparity increases the risk of graft failure
- HLA class II allele disparity increases the risk of GVHD
- Single allele disparity is well tolerated
- Avoid multiple allele disparity

今回の解析はCMLの患者に限って行ったものであり、その他の疾患についてはまだ解析されていない。

また以下のような疑問が次に湧いてくる。すなわち、移植を必要とする多くの患者にHLAが完全に適合したドナーを見つけることは、現実問題として困難である。では

Do all mismatches contribute equivalent risk to graft failure, GVHD and mortality?

1. Locus effects?

2. Allele effects?

3. Race/ethnicity of recipient and donor? (Fig. 1)

このような疑問の答えを得るためにJMDPとの共同研究を行った。Table38にフレッドハッチンソンとJMDPで行われた移植で、HLA-A、B allele不適合ペアのallele組み合わせとその数を示している。この比較で明らかなように人種によりミスマッチのallele組み合わせがまったく異なることが解る。(筆者註：ここで光栄にも我々が作成したスライドが使用された。)

3.4 今後の研究課題

これから我々が焦点を絞って取り組む問題は以下のような事項であると考える。

- Effect of class I and II allele disparity in
➤ Chronic leukemia

- Acute leukemia
- Marrow failure
- Non-malignant disease

- Importance of non HLA variable which affect outcome

Thank you

ー筆者コメントー

講師のEffieとは事前にディスカッションをした。日本人ではclass Iの、白人ではclass IIのミスマッチが臨床的に有意であるという相反する結果について、次のようなアグリーメントを得た。日本人の mismatchの大勢はA*0201 vs. 0206、A*26 alleleミ

スマッチ、B*4002 vs. 4006であるに対し、白人ではそれ以外例えばB*35、B*44 alleleミスマッチである。またDR allele mismatchの組合せも異なる（データ省略）。日本人でmismatchの組合せはimmunodominantで白人のその組合せは臨床に影響が少ない（permissible mismatch）ことが考えられる。

Table 37. Mortality

Proportional Hazards Regression Model*			
Disparity +	Number of pairs	Hazard Ratio (95% CI)	p value
Allele Match	142	1.0(-)	
Single class I	55	1.2(0.7-2.1)	0.4
Multiple class I	35	3.5(2.1-5.9)	<0.001
Single class II	24	1.0(0.5-2.1)	0.89
Class I and class II	37	3.3(2.0-5.5)	<0.001

*: Adjusted for stage of disease, body weight index, time interval from diagnosis to transplant, patient age at time of transplant, availability of fluconazole and ganciclovir, and patient CMV seropositivity.

+: Seven patients had multiple class II mismatches, and 3 died.

Table 38. The comparison between FHCRC and JMDP for HLA-A, B mismatch

HLA-A	FHCRC (N=300)	JMDP (N=165)	HLA-B	FHCRC (N=300)	JMDP (N=165)
0201/0225	1	0	1401/1402	3	0
0201/0205	8	0	1501/1507	1	4
0201/0206	2	25	1501/1518	0	1
0201/0207	0	5	2702/2705	3	0
0201/0210	0	3	2705/2709	1	0
0201/0211	2	0	3501/3502	1	0
0206/0210	0	3	3501/3503	10	0
0301/0302	4	0	3501/3508	1	0
2402/2403	2	0	3502/3503	2	0
2402/2407	1	0	3502/3505	1	0
2601/6601	1	0	3502/3508	2	0
2601/2602	0	3	3503/3508	1	0
2601/2603	0	4	3508/35 new	1	0
2602/2603	0	2	3901/39062	4	0
2901/2902	3	0	3902/3904	0	1
3001/3002	4	0	4002/4011	1	0
3301/3302	4	0	4002/4003	0	1
6801/6802	2	0	4002/4006	1	17
	32	45	4003/4006	0	1
			4402/4403	11	0
			4402/4405	3	0
			4403/4405	3	0
			5101/5103	1	0
			5101/5108	1	0
			5501/5502	1	0
			2702/270517	1	0
			0702/07new	1	0
				55	25

Fig. 1: HLA-A2 allele frequencies
12th IHW, 1996

