

ヒト骨髄の冷凍保存に関する研究-2-自家骨髄移植による悪性腫瘍の新しい治療法

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8875

ヒト骨髄の冷凍保存に関する研究

II. 自家骨髄移植による悪性腫瘍の新しい治療法

金沢大学医学部第3内科

石野千津子

(昭和55年11月25日受付)

本論文の要旨は第20回臨床血液学会総会、第42回日本血液学会総会において発表した。

一般的に悪性腫瘍の治療において、投与される抗癌剤や放射線照射の抗腫瘍効果はその量に比例して大きくなる¹⁾。しかし、同時に存在する骨髄抑制作用はしばしば患者の予後を左右する重大な要因となり、投与量はおのずから制限される。このような強い骨髄抑制に対して造血幹細胞の replacement ができれば、致命的な造血不全からの回復が期待され、これによって抗癌剤の大量投与や致死量の X 線照射が可能となり、悪性腫瘍の治療成績を向上させる新しい治療法の確立を目指すことができる。前編で、顆粒球素前駆細胞 (CFU-C) を造血能の指標として種々の角度からヒト骨髄冷凍保存条件の基礎的検討を行い、その至適条件を設定した。そこで本編では、この方法を用いて自家骨髄移植を行うこととし、急性白血病および悪性リンパ腫症例に実施し、悪性腫瘍に対する新しい治療法として十分期待しうる良好な成績が得られたので報告する。

対象および方法

1. 対象

昭和52年3月より55年6月の期間に金沢大学第3内科に入院した急性白血病4症例および悪性リンパ腫を主とするその他の悪性疾患5症例を対象とした。白血病症例の内訳は急性骨髄性白血病 (AML) 3名、急性リンパ性白血病 (ALL) 1名であり、その他の悪性疾患は stage III-IV の Non Hodgkin's lymphoma (NHL)、鼻咽頭癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 1名であった。

2. 骨髄採取

白血病患者では原則として初回完全寛解期間中に、1) 骨髄が normocellular であること、2) CFU-C が正常に回復していることを確認し、骨髄採取を

行った。その他の悪性疾患では1) 骨盤部照射の既往のない、2) 骨髄穿刺および生検、骨髄スキャン、全身腫瘍スキャンで骨髄侵襲のないことが確認された症例を対象に、原則として治療開始前に骨髄採取を行った。骨髄採取は Thomas ら²⁾の方法に準じて行った。即ち全身麻酔下で両側腸骨より頻回の骨髄穿刺によって約600 mlの骨髄液を得、TC-199 (Flow Lab. Rockville) ヘパリン液 (ヘパリン 50単位/ml) の等量と混和し血液バックに移し遠心機 (International PR 6000) で1500rpm 7分間遠心し、上清は-20℃で凍結保存した。

3. 冷凍保存

冷凍保存法の詳細は既に報告した³⁾。まず遠心後 buffy coat を含む沈層に等量の凍害保護液 (20% の dimethyl sulfoxide, DMSO) と同型血漿 30% を含む TC-199 培養液を緩徐に、よく混和しながら添加した。これを液体窒素に耐える血液凍結バック (Gambro Hemofreezing bag, GAMBRO Japan) 1000 ml 用に 300~400 ml づつ分注し、プログラムフリーザー (荏原製作所, PF22, 東京、あるいは Cryo Med # 900/972Mt Clemens, Michigan) に静置した。-1℃/min の冷却速度で-70℃まで凍結し、終了後ただちに液体窒素中 (-196℃) に保存した。

4. 解凍

解凍は使用直前に40℃の恒温槽で急速解凍によって行い、自己血漿もしくは同型血漿10%を含むTC-199培養液をゆっくり、よく混和しながら加えて2倍以上に希釈し遠心洗浄を行った。さらにもう1回遠心洗浄した後、細胞数を算定し経静脈的に患者に投与した。また凍結前後に造血能の指標としてCFU-C測定をPikeら⁴⁾の方法に従って行い、CFU-C回収率も算定

Study on Cryopreservation of the Human Bone Marrow Cell. II. Clinical Application of Autologous Bone Marrow Transplantation to Malignant Neoplasm. Chizuko Ishino, Department of Internal Medicine (III), Kanazawa University School of Medicine, Kanazawa, Jpn.

した。

5. 自家骨髄移植

自家骨髄移植をいつ行うかは治療効果に影響を及ぼす非常に重要な因子で、個々の症例で慎重に検討する必要がある。白血病症例では次の再発時に、前回の寛解導入療法より強力な多剤併用寛解導入療法を施行し、治療終了後4～5日目に骨髄像から白血病細胞の明らかな減少を確認した上で解凍自家骨髄を投与した。

悪性リンパ腫およびNPCの症例では、骨髄を採取冷凍保存した後、通常の化学療法、局所放射線療法を行い、寛解導入ならびに腫瘍の治療に対する感受性の確

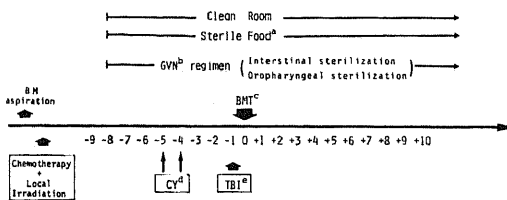


図1 Schedule for autologous bone marrow transplantation

- a: sterilized with an electric oven
- b: Gentamicin+Vancomycin+Nystatin
- c: Bone marrow transplantation
- d: Cyclophosphamide (60mg/kg/day)
- e: Total body irradiation (1000rad)

認をし、原則として比較的早期に骨髄移植を施行した。移植1週間前より high efficiency particulate air (HEPA) フィルターを用いた laminar air flow clean room (class 1000) に患者を収容し、腸内殺菌、気道内殺菌、無菌食の投与を行った。この無菌室治療の詳細は既に舟田ら⁵⁾が報告している。移植前処置として、移植前5日、4日の両日に cyclophosphamide(CY) 60 mg/kg/day を静脈内に投与し、同時に大量の補液と利尿剤および重曹の投与を行い、尿量の確保、出血性膀胱炎の予防をはかった。さらに移植前日に linear accelerator (三菱 M II B,10MV) による1000radの全身照射 (total body irradiation, TBI) を施行し、24時間後に解凍自家骨髄移植を行った(図1)。移植後血小板輸血、発熱時には抗生剤、γ-グロブリン、インターフェロン投与、顆粒球輸血などの補助療法を行った。

成 績

1. 骨髄採取

白血病4症例およびその他の悪性疾患5症例における採取骨髄の量、細胞数、CFU-C数をまとめて表1に示した。年齢は20～59才、269～1040 ml、平均563 mlの骨髄液穿刺により、 $0.67 \sim 5.9 \times 10^{10}$ 個、平均 1.72×10^{10} 個の骨髄細胞を採取し前述の方法で冷凍保存した。

Table 1. Volume and cellularity of aspirated bone marrow

Patient	Age	Sex	Diagnosis	Total aspiration volume (ml)	Total cells number($\times 10^{10}$)	CFU-C ^a
1 K.K.	48 y	M	AML ^b	269	1.13	135±13
2 K.Y.	59 y	M	AML	605	0.86	42±12
3 K.S.	29 y	M	AML	380	1.14	68±8
4 Y.T.	20 y	F	ALL ^c	375	0.67	63±7
5 S.K.	27 y	M	LS ^d	1040	5.90	5±2
6 R.M.	42 y	F	LS	360	0.99	40±2
7 K.N.	52 y	M	LS	810	1.53	18±4
8 S.K.	36 y	M	LS	730	1.94	73±13
9 Y.M.	28 y	M	NPC ^e	500	1.39	42±4
				563	1.72	

a: Mean number of colonies on four plate \pm S.D./ 2×10^5 bone marrow cells

b: Acute myeloblastic leukemia

c: Acute lymphocytic leukemia

d: Lymphosarcoma

e: Nasopharyngeal carcinoma

Table 2. Cell recovery and CFU-C recovery of cryopreserved and thawed bone marrow

Patients				Time of storage	CFU-C/2×10 ⁵ cells Fresh/thawed	Cell recovery (%)	CFU-C recovery* (%)
1	KK (M)	48 y	AML ^b	8.0 M	135/198	21.0	30.8
2	KY (M)	59 y	AML	4.0 M	42/ 31	44.2	32.6
3	KS (M)	29 y	AML	9.0 M	68/ 48	26.6	18.3
4	YT (F)	20 y	ALL	7.0 M	63/ 58	35.8	36.0
5	SK (M)	27 y	LS	2.0 M	5/ 13	18.6	48.3
6	RM (F)	42 y	LS	3.5 M	40/ 34	47.5	40.4
7	KN (M)	52 y	LS	9.7 M	18/ 52	14.6	42.3
8	SS (M)	36 y	LS	2.5 M	73/ 61	60.8	50.8
9	YY (M)	28 y	NPC	3.0 M	42/ 71	36.7	62.0
Mean ± S.D.						34.0±15.2	40.2±12.6

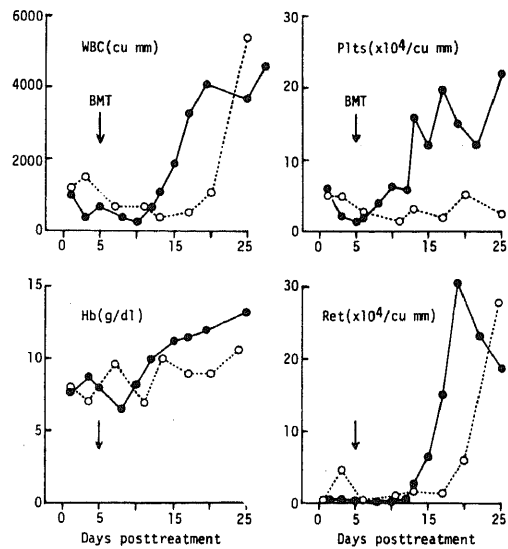
a: $\frac{\text{CFU-C}/2 \times 10^5 \text{ frozen bone marrow cell}}{\text{CFU-C}/2 \times 10^5 \text{ fresh bone marrow cells}} \times \text{Cell recovery (\%)} \times 100$
 b: See the footnote in Table 1

2. 解凍成績

以上の9症例における骨髄の冷凍保存-解凍成績を表2に示した。保存期間は2.0~9.7ヵ月、平均5.4ヵ月、細胞回収率は14.6~60.8%、平均34.0%、CFU-C回収率は18.3~62.0%、平均40.2%であった。

3. 急性白血病

症例1 (K. K.), 48才, 男性, 1975年AMLと診断され当科入院。多剤併用寛解導入療法を3回施行したが完全寛解に至らなかった。1976年, cytosine arabinoside(CA) によるsynchronizationに続いてdaunorubicin (DM), CA, vincristin (VCR), prednisolon(Pred)による4者併用療法により1977年1月完全寛解となった。骨髄造血能の回復を待って3月10日に269 mlの骨髄液を採取し冷凍保存した。同年12月に再発を認めCAによるsynchronizationの後, DM, CA, neocarzinostatin, 6-mercaptopurine riboside (6MP), Pred.による多剤併用療法後5日目に解凍骨髄2.4×10⁹個を自家移植した。治療終了後の血液学的変化(図2)は自家骨髄移植を併用した場合により早い回復がみられた。白血球数が1000以上に回復するのに要した日数は前回は20日であったのに対して, 移植併用時には13日と短く, また血小板数の5万以上の回復は33日に対して10日と著明に短縮していた。網赤血球の回復も同様に促進され, 寛解に達するまでに要した輸血量は移植を併用していないときに比べて約半量であった。一方骨髄細胞の回復も促進され自家移植を併用した場合



○—○: Combination chemotherapy only.
 ●—●: Combination chemotherapy followed by autologous bone marrow transplantation on day 5.

図2 Hematological recovery after treatment with or without the use of cryopreserved autologous bone marrow transplantation in case 1 (K. K.).

には治療終了後18日で有核細胞数5.6万, 芽球2%と完全寛解と診断された。しかし移植を併用していない

前回は24日目にも有核細胞数1.4万と低形成のままであった。移植後完全寛解は10カ月維持されたが1978年11月2回目の再発を認めた。

症例2(K. Y), 59才, 男性, DM, CA, 6MP, PredによるDCMP療法1回で完全寛解導入後, 骨髓冷凍保存を行った。寛解期間6カ月で再発し, DCMP療法2回施行後 3.8×10^9 個の解凍自家骨髓を投与した。再び完全寛解が得られ, また白血球, 血小板の回復は初回寛解導入時に比べて移植併用時には著明に促進されていた。その後無治療で寛解は維持されていたが, 19カ月後に心筋梗塞のため死亡した。

症例3(K. S), 症例4(Y. T)も初回完全寛解導入後骨髓を冷凍保存し, 再発時に, より強力な多剤併用療法と自家骨髓移植を行い, いずれも完全寛解が得られたが, 寛解持続期間は症例3では1.5カ月, 症例4では2.5カ月と短かった。

以上白血病4症例の自家骨髓移植成績のまとめを表3に示した。投与された有核細胞数は $0.21 \sim 0.63 \times 10^8$ 個/kg体重, 平均 0.45×10^8 /kgであり, CFU-Cは $0.41 \sim 4.76 \times 10^4$ 個/kg, 平均 1.87×10^4 /kgであった。症例1(K. K), 2(K. Y)では強力な多剤併用寛解導入療法による骨髓抑制からの回復が, 自家骨髓移植の併用によって明らかに促進されていた。4症例全員に完全寛解が得られ, さらに症例2(K. Y)では移植併用後の寛解維持期間は初回寛解期間より延長していた。

4. 悪性リンパ腫

症例5(S. K), 27才, 男性, 1979年6月左耳下り

リンパ節腫脹, 扁桃腫大, 類白血病反応を認め当科入院。全身性表在リンパ筋腫大, 右外腸骨リンパ節への浸潤, 肝スキャンで多発性陰影欠損を示唆する所見を認めdiffuse poorly differentiated lymphocytic lymphoma (stage IV) と診断された。COP(CY, VCR, Pred)療法と ^{60}Co 照射を行ったが寛解は得られず, 10月10日, 解凍骨髓による自家骨髓移植を施行した。その詳細は既に報告している⁶⁾。移植20日目に白血球数は1000に回復し, 血小板は24日目に11.5万と増加し生着とみなした。この時点でリンパ腫は既に消失し完全寛解と判断され, その後外来で経過観察中であつたが, 1980年10月28日, 移植後383日目に何ら自覚症状もなく, 末梢血および骨髓像で白血化を認め再発した。

症例6(R. M), 42才, 女性, 1979年5月鼠径部リンパ節腫大に気付き他院で生検を受け, 悪性リンパ腫の診断でCYとVCRによる治療が行われ腫瘍は縮小したが副作用出現のため治療を中断して当科に転院した。全身性表在リンパ節腫脹, リンパ管造影にて傍気管リンパ節に浸潤所見を認め, 再度の生検診断はdiffuse poorly differentiated lymphocytic lymphoma (stage III)であつた。

末梢血, 骨髓は正常像を示し, 形態学的に異常な細胞は認められず, 左右腸骨々髄生検でもリンパ腫の骨髓浸襲は認めなかった。そこで8月16日, 360 ml (有核細胞, 8.6×10^9 個)の骨髓を採取し冷凍保存した。骨髓採取後腋下部, 鼠径部に ^{60}Co 4000 radさらに鼠径部に β -tron 4000 radの照射を行い腫瘍は縮小

Table 3. Autologous bone marrow reinfusion in leukemia patients

Patient	Autologous Bone Marrow Reinfusion	Chemotherapy (mg)							Reinfused Marrow		Day WBC >1000	Day Platlet >50,000	Remission Duration
		DM	CA	6MP	Pred.	BHAC	NCS	VCR	Nucleated cells/kg ($\times 10^8$)	CFU-C/kg ($\times 10^4$)			
1. K. K (48M)	(-)	120	560		120		8000(u)	6			20	33	11M
	(+)	120	560	400	120			2	0.48	4.76	13	10	10M
2. K. Y (59M)	(-)	120	480	400	120						20	21	6M
	(+)	280	760	800	240				0.63	0.98	11	14	19M
3. K. S (29M)	(-)	240	640	400	320			2			9	12	8M
	(+)	480		1200	360	2400			0.21	0.41	10	15	1.5M
4. Y. T (20F)	(-)	120			120						NE	NE	7M
	(+)	280			240	1600		4	0.47	1.34	15	10	2.5M

DM : daunomycin CA : cytosine arabinoside 6MP : 6-mercaptapurine riboside Pred : prednisolone
BHAC : N⁴-behenoyl-arabinocytosine NCS : neocarzinostatin VCR : vincristin NE : not evaluable

したが、10月になり右腋下部にリンパ節腫大が再び出現し、増大傾向を認めたため、12月1日、自家骨髄移植を行った。移植前10日より無菌室に入室し、adriamicin 60 mg/day 2日間、CY 60 mg/kg/day 2日間、TBI 1000 rad施行にひき続いて 4.7×10^9 個の自家骨髄移植を行った(図3)。移植当日より右口角に小丘疹として出現した口唇ヘルペスはその後急速に進展し、上下口唇、鼻腔内まで拡がり発赤、腫脹も強く著しい開口制限を来たした。また40℃前後の高熱が持続し、抗生物質(amikacin 400 mg, sulbenicillin 20g/day)の投与、Hemonetics model 30により収集した顆粒球、血小板輸血に加え、口唇にはヒト白血球インターフェロン リップクリームを塗布、さらにインターフェロン計900万単位の筋肉内投与を行ったところ、体温は37℃前後に解熱し、ヘルペスも痂皮形成を認め約1カ月で治癒した。末梢白血球数は移植後7日目に0となり、20日目に1400に回復し網赤血球も出現してきた。骨髄有核細胞数は27日目で6.1万、46日目で21.6万と増加し、CFU-Cも $34 \pm 1/2 \times 10^6$ cellsと移植前値に回復した。移植後肝機能障害、右上肺野に異常陰影、心のう水貯留などを認めたが、いずれも短期間で改善され、移植後1年の現在寛解は維持され社会復帰している。

症例7 (K. N), 52才, 男性, 1978年7月左頸部リ

ンパ節腫大を認め摘出、1979年5月同部位に再び腫瘍出現し生検にて diffuse poorly differentiated lymphocytic lymphoma と診断され、骨髄冷凍保存後 COP 療法と局所放射線治療を受け完全寛解となった。1980年4月 stage III で再発し、局所放射線照射施行後自家骨髄移植を行い、生着、完全寛解が得られた。

症例8 (S. K), 37才, 男性, 1979年4月発症, 11月当科入院。生検にて diffuse mixed lymphocytic-histiocytic lymphoma (stage III) と診断され、1980年1月骨髄採取後 vindacin 3 mg/m^2 7回、局所放射線治療を行いリンパ節腫大は消退したが、完全寛解は得られず自家骨髄移植を行った。生着をみて、完全寛解と判断されたが、移植9週目に pneumocystis carinii 肺炎の併発、両頸部リンパ節の腫大を認めた。そこでステロイド剤、sulfamethoxazole trimethoprim (ST 合剤) を投与したところ、胸部陰影は改善し、リンパ節腫大は急速に消失した。しかし、外来経過観察中、10月末より頸部、腋下部、および肺門部リンパ節の系統的腫大を認め再発した。

以上悪性リンパ腫4例は stage IV もしくは stage III で、できるだけ早期に骨髄移植を行い、全例で生着を認め完全寛解が得られた。しかし、その後症例5と

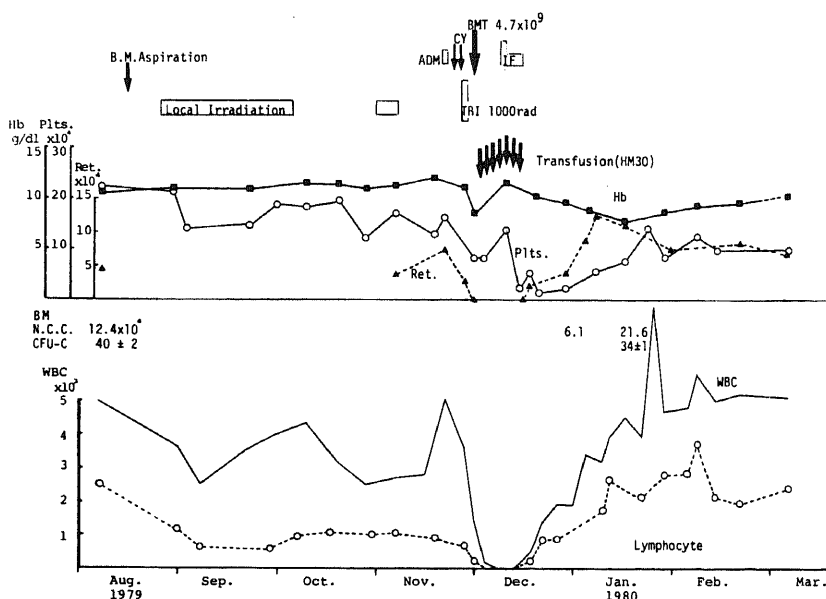


図3 Clinical course of Case 6 (Malignant lymphoma) undergoing Auto-BMT

8は再発を認めたが、移植後24～59週の現在全例生存しており、procedure deathは1例もなかった。

5. 固形癌

悪性リンパ腫の良好な成績から固形癌に対しても自家骨髄移植による治療を試みた。

症例9 (Y. M.), 28才, 男性, 1977年頃より鼻閉感に気付いていたが放置していた。1979年9月右頸部リンパ節腫大を認め転移性癌の診断で入院した。原発巣

は鼻咽腔右側壁で生検診断は nasopharyngeal carcinomaであった。頸部以外のリンパ節、骨髄への転移所見は認めず TNM分類では T₁N₂b Moと考えられた。まず、移植前治療として鼻咽腔に⁶⁰Co 6000 rad 頸部に3000 rad さらに頸部にβ-tron 2700 radの局所照射を行ったところ、腫瘍は完全に消失した。さらに腫瘍細胞の根絶を目指して前述の術式で自家骨髄移植(1.37 × 10⁸/kg)を行った(図4)。移植

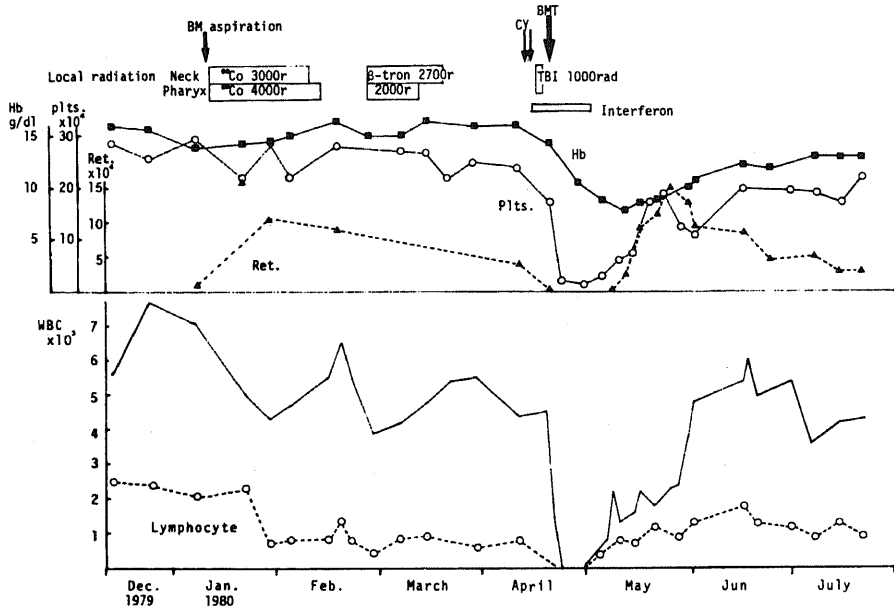


図4 Clinical course of Case 9 (Nasopharyngeal carcinoma) undergoing Auto-BMT

Table 4. Hematologic recovery and response after autologous bone marrow transplantation in malignant lymphomas and solid tumor

Patient No.	Age	Sex	Diagnosis (Stage)	No. of Cells grafted/kg ($\times 10^8$)	No. of CFU-C grafted/kg ($\times 10^4$)	Hematologic Recovery (Days)			Antitumor Response		Survival Duration ^d (Weeks)		
						WBC >10000	Granulocyte >500	Platlet >50000 >100000	Degree	Duration ^d (Weeks)			
5.	S K	27	M	LS ^a (IV)	1.9	1.23	21	21	23	28	CR ^c	55	59+
6.	R M	42	F	LS (III)	0.88	1.49	20	24	37	60	CR	48+	48+
7.	K N	52	M	LS (III)	0.41	1.04	18	32	37	48	CR	24+	24+
8.	S K	37	M	LS (III)	1.97	6.0	22	31	24	41	CR	9	34+
9.	Y M	28	M	NPC ^b (T ₁ N ₂ bMo)	1.37	4.85	19	23	21	30	CR	32+	32+
Mean				1.31	2.9	20	26	28	43				

a : lymphosarcoma

b : nasopharyngeal carcinoma

c : complete response

d : updated as of November 30, 1980

19日目でWBCは1000以上になり、血小板数も21日目には5万以上に増加し生着と考えた。本例では無菌室治療に加えて、ウイルス感染予防のため移植前3日よりインターフェロン1日40万単位を17日間投与した。38.5℃以上の発熱はわずか2日間みられただけであり、抗生剤投与や顆粒球輸血は必要としなかった。

以上CY-TBI療法後に自家骨髄移植を行った5症例について、移植細胞数、CFU-C数、血液学的回復、臨床効果をまとめて表4に示した。投与された細胞数は平均 1.31×10^6 /kg、CFU-Cは 2.9×10^4 /kgであった。末梢白血球数が1000以上に回復したのは移植18～22日、平均20日目であり、顆粒球実数は平均26日で500以上となり、また血小板数は21～37日、平均28日で5万以上に増加し、全例で生着と考えられた。臨床効果は既に述べたように全例で完全寛解が得られ、2例の再発例を除き他の症例は社会復帰している。

移植後の合併症としては、全例に一過性もしくは持続性の肝機能異常が出現している。これは移植前の大量のCY投与、TBIによる副作用の可能性が最も考えられるが、症例5(S.K)は肝生検で急性肝炎の診断を得ており、また、症例6(R.M)は移植前より慢性B型肝炎が存在し、経過中にe抗原の出現、消失を認めるなど、肝障害はウイルス肝炎によることも考えられる。発熱は全例にみられ、その期間は2～16日であった。抗生剤、インターフェロン、 γ グロブリン、顆粒球輸血などの補助療法を受けている。口腔内ヘルペスは全例に出現し、臨床症状と発熱期間はほぼ一致し、ウイルス感染が発熱の重要な要因と考えられた。症例7, 8, 9ではウイルス感染予防のためインターフェロンの予防投与を行ったが完全防止はできなかった。しかし、いずれも症状は軽く、インターフェロンの局所投与を追加することによって早期に治癒が得られ、インターフェロンは有効であると判定された。また、同種移植で予後を左右する重篤な合併症となる間質性肺炎は、症例8でpneumocystis cariniiによる軽症例が1例みられただけであった。

考 察

悪性腫瘍治療後の骨髄抑制に対して、自家あるいは同種骨髄を利用する試みは1958年頃より見られる。McFarlandら⁷⁾は末期悪性リンパ腫患者に大量のnitrogen mustardを投与し、直後に新鮮自家骨髄の輸注を行い、またFerree⁸⁾, Kingら⁹⁾は大量の放射線照射(TBI 300～600 rad)後に自家もしくは同種骨髄を投与し、骨髄不全からの血液学的回復が良好で

あったと報告している。冷凍保存されたヒト骨髄による自家移植の最初の試みは、1958年Kyrnick¹⁰⁾によって行われ、以後同様の試みが多数報告されていく^{11)～15)}。しかし十分な化学療法が施行されていなかったり、投与された骨髄有核細胞数が少ないことなどから自家骨髄移植の有効性は必ずしも評価されないままであった。しかしその後in vitroで造血幹細胞を定量的に評価することが可能になった⁴⁾¹⁶⁾。このような造血幹細胞研究の進歩とともに、冷凍保存骨髄による自家移植は1970年代後半より再び注目を集めるようになり、種々の角度から検討されるようになった。さらにこのような背景には急性白血病に対する有力な治療法として、致死的な化学療法、放射線療法後にHLAの一致する同胞から同種骨髄移植を行うという治療術式がほぼ確立され、非常に良好な成績^{17)～19)}が報告されるようになったことが考えられる。しかし、同種移植では拒絶反応や生着後に起ってくるgraft versus host disease(GVHD)、間質性肺炎などの合併症が大きな障害になっている²⁰⁾。また治癒を期待できるこの治療法も、HLAの一致するdonorの選択という制約があり、これも同種移植における今後の大きな課題のひとつといえる。一方自家移植は同種移植とは異なり、免疫学的な問題やdonorの選択の必要がないことなどが有利な点として特に関心を集めるようになったものと思われる。

自家骨髄移植を成功させるためには、1) 採取骨髄が十分な造血能を有する、即ち骨髄抑制から回復するに十分な造血幹細胞が得られること、2) 採取骨髄中に悪性腫瘍細胞が存在しないこと、3) 腫瘍細胞が強力な化学療法、放射線療法に対して高い感受性を有すること、さらに4) 全身状態がこのような強力な、場合によってはsupralethalな治療に耐え得ること、などを考慮しなければならない。以上のような条件から判断して卵巣癌¹⁵⁾¹¹⁾、精巣癌、oat cell carcinoma²²⁾²³⁾、悪性リンパ腫²⁴⁾²⁵⁾、白血病^{26)～29)}などが最もよい適応と考えられる。白血病ではたとえ完全寛解であっても白血病細胞は残存し、さらに同種骨髄移植において高頻度の再発がみられる¹⁸⁾ことから、必ずしも自家骨髄移植のよい適応とはいえない。しかしながら今回のpreliminary studyとして行った急性白血病4症例における自家骨髄移植はいずれも寛解導入が困難であった症例であり、4例全例に完全寛解が得られたことは自家骨髄移植の有用性を示しているといえよう。具体的には、症例1, 2では白血球数、血小板数の正常回復化が前回の寛解導入療法時に比較して、著しく短縮され、また症例1では初回の完全寛解

導入に4回の多剤併用療法を要したのにくらべ、自家骨髄移植を併用することにより1回の寛解導入療法で完全寛解が得られた。さらに症例2では初回の寛解期間より自家骨髄移植併用後の寛解期間が明らかに延長していたことなど、自家骨髄移植が寛解期間延長にも有効なことを示唆している。また症例1, 2では48才, 59才と高齢であり、通常の寛解導入療法によっても著明な骨髄抑制が容易にもたらされており、自家骨髄移植は骨髄抑制からの回復を促進する補助療法としての意義を示している。しかしながら、その他の症例では症例1, 2で認められた効果は得られなかった。その理由は実施された寛解導入療法が抗白血病効果の点でも、また骨髄抑制の点でも十分でなかったためと思われる。Dickら²⁸⁾は白血病9例に対して大量の piperadinedione(25 mg/m²)と900 radのTBI後に、完全寛解期の冷凍保存骨髄による自家移植を行い、6例に生着、4例に完全寛解という結果を得ている。したがって自家骨髄移植による急性白血病の治療では、できる限り強力な寛解導入療法を行うことが重要であり、また移植される骨髄中に残存する白血病患者細胞を何らかの方法、例えば *in vitro* で抗白血病患者細胞抗体で処理する³⁰⁾³¹⁾などで白血病患者細胞を可及的に除去しておくことも今後検討する必要があるであろう。いずれにせよ、これまで骨髄抑制のため限界とされていた抗白血病患者治療における治療量を大巾に増加しても、自家骨髄移植によるいわゆる bone marrow rescue が可能となり、これによって難治性白血病患者の治療ばかりでなく、従来より強力な白血病患者治療が安全に実施できることになり、治療成績の向上が今後大いに期待される。

既に述べたように、自家骨髄移植は悪性リンパ腫の治療にも応用されている²⁴⁾²⁵⁾。今回自家移植を実施した悪性リンパ腫はstage III～IVで、通常行なわれる局所放射線治療および化学療法に加えて、supralethal doseと考えられる大量のCY(120 mg/kg)および1000 radのTBIによる治療を行ったにもかかわらず、全例生着を認め、現在169～417日間全例生存している。諸家の報告とは異なり、1例も procedure death を認めなかったことは、この治療法が安全に施行しうることを示しており、悪性リンパ腫以外の悪性疾患にも応用可能であると思われる。事実NPCに対して実施した自家骨髄移植でも同様な結果が得られ、血液学的回復、合併症の点でも悪性リンパ腫よりむしろ良好な経過を示し、移植後235日に至る現在、再発の徴候も全くなく、社会復帰している。

自家移植では同種移植とは異なり、生着の証明に性染色体や赤球血抗原などの genetic marker が利用で

きないので、末梢血や骨髄像から造血能の回復を確認することによって生着とみなすより他に方法はない。このような考え方から、白血球数1000/cm以上を造血能回復のひとつの基準とすると、これに要する期間は18～22日、平均20日で全例生着と判断された。また血小板は21～37日、平均28日で5万以上に増加し、出血傾向を認めた症例はなかった。

造血能の回復は投与された有核細胞数¹⁴⁾³²⁾、特にCFU-C²⁵⁾³³⁾に相関するといわれる。しかしわれわれの症例では、投与された細胞数やCFU-C数と生着に要する期間との間に相関はみられなかった。これに対する説明としては、投与細胞数は体重1kg当り10⁸以下の症例もあったが、CFU-Cの投与数は全例とも10⁴/kg以上であり、この投与量では差が出ないものと思われる。Spitzerら³³⁾は白血病患者11例、固形腫瘍13例における自家骨髄移植で投与されたCFU-C数と血液学的回復を検討し、その結果CFU-C数0.7×10⁸/kg以下のグループでは白血球の回復に要する日数が有意に延長していたと述べている。したがって投与細胞数やCFU-C数の最少量を決定することは今後の課題の1つであろう。

悪性リンパ腫の治療成績は一般に、まずその組織型に左右され、さらに完全寛解が達成されるか否かにかかっている。末期悪性リンパ腫stage III, IVに対する従来の多剤併用療法による治療成績は、完全寛解達成率が34～71%であり³⁴⁾、完全寛解達成者の30ヵ月生存率は70～90%である³⁵⁾。これに対して自家骨髄移植はこれらの化学療法に抵抗性となり寛解の得られない再発症例を対象に行なわれ、Appelbaumら²⁴⁾は9例中7例に完全寛解を報告している。われわれの悪性リンパ腫例はstage III, IVであるが、治療開始から比較的早い時期に自家骨髄移植を行っている。したがって移植前の合併症もなく、患者は全例強力な治療に耐えることができ、一応完全寛解に導くことができた。急性白血病患者に対する同種移植の場合も、Thomasら³⁶⁾は早期にしかも完全寛解中に移植を行う方が治療成績が良いとしている。自家移植も同様に完全治癒を目的として実施する場合には当然早期に行った方が良好な成績が得られるであろう。

ところで、われわれの悪性リンパ腫4例の自家移植例中2例に再発を認めた。再発の原因としては、まず第1に採取保存した骨髄中に腫瘍細胞が存在していたこと、第2に移植前に行ったCY-TBI療法では腫瘍細胞の根絶ができなかったことが考えられる。とくに症例5では骨髄を採取保存する前から類白血病患者反応がみられ、さらに骨髄細胞のCFU-Cは5±2/2×10⁵

cellsと低下しており、骨髄生検で腫瘍細胞は認められなかったものの、骨髄侵襲が既にあった可能性は高く、自家骨髄移植における最も重大な問題点を提起している症例と考えられる。しかし約1年間の完全寛解維持はstage IVのNHL症例としては従来の化学療法単独に比較して良好な成績と思われ、延命効果は十分にあったと考えられる。

症例8 (S. K)においては、移植9週後と比較的早期にリンパ節腫大が出現したことから、移植前の大量のCY-TBIによっても腫瘍細胞を撲滅できなかったという可能性が高く、したがってより効果的な治療法を開発する必要がある、これも今後の大きな課題であろう。CY-TBI療法は最も強力な抗腫瘍療法のひとつであり、白血病の同種骨髄移植では治癒¹⁸⁾も得られているが、悪性リンパ腫においては必ずしも効果的といえないかもしれない。いずれにせよ、移植前にどのような治療を行うかということは、いつ移植を行うかという問題とともに、今後検討されるべき課題である。

骨髄細胞の凍結保存、解凍洗浄の方法は研究者によりさまざまである。全血のまま保存すると解凍後溶血赤血球から遊離したヘモグロビンを除去するために、必ず洗浄操作が必要となる^{13,37)}。この洗浄のときに、破壊された成熟顆粒球がaggregationやclumpingを起し、このため最終的な細胞回収率を著しく低下させる。したがって細胞回収率を高めるためには、凍結前に赤血球や成熟顆粒球を何らかの方法で除去して、造血幹細胞に富む分画を冷凍保存し、解凍後洗浄操作を省いてそのまま移植することも可能である。Wellsら³⁸⁾はdextranあるいはficoll-hypaqueを用いCFU-Cの分離、保存を検討している。この方法の有利な点は保存する容量が少なく済み、多数例の骨髄保存に好都合であることだが、同時に冷凍保存に際して煩雑な分画操作が加わることになる。全血保存法による9例の平均CFU-C回収率は $40.2 \pm 12.6\%$ あり、Wellsら³⁸⁾のCFU-C回収率 $47.8 \pm 20.8\%$ より低値であるが、全例に生着が認められたことから、臨床的にも十分使用できるものと考えられる。

同種移植においては、移植前に実施されるsupralethalな化学、放射線療法によってもたらされる造血不全や免疫不全状態を背景として生じる、いわゆるopportunistic infectionやGVHDが予後を左右する大きな要因となっている。この対策としてlaminar air flow clean roomへの隔離、腸内殺菌、無菌食投与などによる無菌室治療、効果的な抗生剤投与、顆粒球輸血などの補助療法が不可欠である。しかしこのよ

うな補助療法を精力的に行っても、間質性肺炎、敗血症などの感染症が高頻度に発生し、当科における同種移植の生着例でも、このような感染症による死亡例を5例中3例に認めている³⁹⁾。これに比して、自家移植例では全例生存し、重篤な合併症を起すには至らなかった。これは自家移植ではGVHDのないこと、またその予防のために免疫抑制療法が不要なこと、さらに、同種移植例にくらべて自家移植症例の方が移植後の免疫不全状態からの回復の早いこと⁴⁰⁾などが関係しているものと考えられる。

結 論

悪性腫瘍の治癒を目指す新しい治療法として、10% DMSOを凍害保護剤として用い、液体窒素中に冷凍保存した骨髄による自家骨髄移植を行った。まず治療抵抗性となった急性白血病患者4例に初回治療より強力な多剤併用療法と、寛解時に採取保存しておいた解凍骨髄による自家骨髄輸注を行い、全例に完全寛解、2例に治療後の骨髄抑制期間の短縮効果、1例に寛解期間の延長を認めた。

また、骨髄侵襲のないstage IIIおよびIVの悪性リンパ腫4例、および鼻咽頭癌1例に対して、治療開始前に骨髄を採取、冷凍保存し、通常の化学療法、局所放射線療法で腫瘍細胞を減少させ、さらに致死量のCY (120 mg/kg)とTBI (1000 rad)後に自家骨髄移植を行った。5例全例で骨髄不全からの血液学的回復、即ち生着を認め、完全寛解が得られ、procedure deathは1例もなかった。リンパ腫2例は2カ月と1年後に再発を認めたが、その他の症例は無治療で寛解を維持し、移植169～417日後の現在全例生存中である。

自家骨髄移植は致死量の化学療法、放射線療法後の骨髄造血不全に対する効果的な方法であり、通常の治療では不治といわれる悪性腫瘍の延命、治癒を目指す新しい治療法と思われる。

稿を終るに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師服部絢一教授に深謝いたします。また始終御指導、御助言を戴いた本学輸血部原田実根講師に深く感謝いたします。併せて種々の御協力をいただいた第3内科骨髄移植班の諸先生、また三輪晴美、油谷秀子嬢に厚くお礼を申し上げます。

本研究は文部省科学研究費(444073, 587062)によりなされた。記して感謝の意を表する。

文 献

1) Goldin, A. : Factors pertaining to complete drug-induced remission of tumor in animals and man. *Cancer Res.*, **29**, 2285-2291,

(1969).

- 2) **Thomas, E. D. & Storb, R.** : Technique for human marrow grafting. *Blood*, **36**, 507 - 515, (1970).
- 3) 原田実根, 石野千津子, 岡藤和博, 吉田嵩, 森孝夫, 三田村英一, 服部絢一 : 冷凍保存骨髄による自家骨髄移植の試み. *医学のあゆみ*, **106** : 845 - 847, (1978).
- 4) **Pike, B. L. & Robinson, W. A.** : Human bone marrow colony growth in agar - gel. *J. cell Physiol.*, **76**, 77 - 84, (1970).
- 5) 舟田久, 丹羽和夫, 藤田信一, 服部絢一 : 骨髄移植における無菌室治療の実際・最新医学, **34**, 1274 - 1282, (1979).
- 6) 近藤邦夫, 石野千津子, 大竹茂樹, 塩原信太郎, 末永孝生, 森孝夫, 幸道秀樹, 吉田嵩, 中村忍, 服部絢一, 立野育郎 : 大量の cyclophosphamide 投与と全身 X 線照射後自家骨髄移植を施行した Non - Hodgkin's lymphoma の 1 症例, *臨床血液*, **21**, 印刷中
- 7) **McFarland, W., Granville, N. B. & Dameshek, W.** : Autologous bone marrow infusion as an adjunct in therapy of malignant disease. *Blood*, **14**, 503 - 521, (1959).
- 8) **Ferrebee, J. W. & Thomas, E. D.** : Radiation injury and marrow replacement : Factors affecting survival of the host and homograft. *Ann. Int. Med.*, **49**, 987 - 1003, (1958).
- 9) **King, E. R.** : Use of total - body radiation in the treatment of far - advanced malignancies. *J. A. M. A.*, **177**, 610 - 613, (1961).
- 10) **Kurnick, N. B., Montans, A., Gerdes, J. C., & Feder, B. H.** : Preliminary observations on the treatment of postirradiation hematopoietic depression in man by the infusion of stored autogenous bone marrow. *Ann. Int. Med.*, **49**, 973 - 986, (1958).
- 11) **Black, M. M., Speer, F. D., & Stone, M. L.** : Protective action on autologous marrow against nitrogen mustard toxicity. *Ann. Int. Med.*, **51**, 517 - 525, (1959).
- 12) **Newton, K. A., Humble, J. G., Wilson, C. W., Pegg, D. E., & Skinner, M. E. G.** : Total thoracic supervoltage irradiation following by the intravenous infusion of stored autologous marrow. *Br. Med., J.*, **11**, 531 - 535, (1959).
- 13) **Kurnick, N. B.** : Autologous and isologous bone marrow storage and infusion in the treatment of myelo - suppression. *Transfusion*, **2**, 178 - 187, (1962).
- 14) **Pegg, D. E., Humble, J. G., & Newton, K. A.** : The clinical application of bone marrow grafting. *Br. J. Cancer*, **16**, 417 - 435, (1962).
- 15) **Buckner, C. D., Rudolph, R. H., Fefer, A., Clift, R. A., Epstiein, R. B., Funk, D. D., Neiman, P. E., Slichter, S. J., Storb, R., & Thrmass, E. D.** : High - dose cyclophosphamide therapy for malignant disease. *Cancer*, **29**, 357 - 365, (1972).
- 16) **Iscove, N. N., Senn, J. S., Till, J. E., & McCulloch, E. A.** : Colony formation by normal and leukemic human marrow cells in culture : Effect of conditioned medium from human leukocytes. *Blood*, **37**, 1 - 5, (1971).
- 17) **Gale, R. P. for the UCLA Boen Marrow Transplant Team** : Bone marrow transplantation in acute leukemia. *Lancet*, **2**, 1197 - 1200, (1977).
- 18) **Thomas, E. D., Buckner, C. D., Banaji, M., Clift, R. A., Fefer, A., Flournoy, N., Goodell, B. W., Hichman, R. D., Lerner, K. G., Neiman, P. E., Sale, G. E., Sanders, J. E., Singer, J., Stevens, M., Storb, R. & Weiden, P. L.** : One hundred patient with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood*, **49**, 511 - 533, (1977).
- 19) **Graw, R. G.** : Bone marrow transplantation following combination chemotherapy immunosuppression (B. A. C. T.) in patients with acute leukemia. *Transplant. Proc.*, **6**, 349 - 354, (1974).
- 20) **Neiman, P. E., Thomas, E. D., Reeves, W. C., Ray C. G., Sale, G., Lerner, K. G., Buckner, C. D., Clift, R. A., Storb, R., Weiden P. L. & Fefer, A.** : Opportunistic infection and interstitial pneumonia following marrow transplantation for aplastic anemia and hematologic malignancy. *Transplant. Proc.*, **8**, 663 - 667, (1976).
- 21) **Tobias, J. S., Weiner, R. S., Griffiths, C. T., Richman, C. M., Parker, L. M., Bowers, M. C. & Yankee, R. A.** : Autologous bone marrow

- transplantation following high dose chemotherapy. Clin. Res., 23, 344A, (1975).
- 22) Graze, P. R., Wells, J. R., Ho, H., Gale R. P., & Cline, M. J. : Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow stem cells in man. Transplant., 27, 142-145, (1979).
- 23) Dick, K. A., Spitzer, G., Zander, A. R., Lanzotti, V. J., Verma, D. S., Peters, L. J., Valdivieso, M., Lotzova, E. & McCredie, K. B. : Autologous bone marrow transplantation in relapsed adult acute leukemia and solid tumors. Transplant. Proc., 11, 212-214, (1979).
- 24) Appelbaum, F. R., Herzig, G. P., Ziegler, J. L., Graw, R. G., Levine, A. S., & Deisseroth, A. B. : Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patient with malignant lymphoma. Blood, 52, 85-95, (1978).
- 25) Kaizer, J., Leventhal, B. G., Wharam, M. D., Munoz, L. L., Elfenbein, G. J., Tutschka, P. J., & Santos, G. W. : Cryopreserved autologous bone marrow transplantation in the treatment of selected pediatric malignancies : A preliminary report. Transplant. Proc., 11, 208-211, (1979).
- 26) Dick, K. A., McCredie, K. B., Stevens, E. E., Spitzer, G., & Bottino, J. C. : Autologous bone marrow transplantation in a case of acute adult leukemia. Transplant. Proc., 9, 193-195, (1977).
- 27) Gorin, N. C., Najman, A., & Duhamel, G. : Autologous bone marrow transplantation in acute myelocytic leukemia. Lancet, 1, 1050, (1977).
- 28) Dick, K. A., McCredie, K. B., Spitzer, G., Zander, A., Peters, L., Verma, D. S., Stewart, D., Keating, M., & Stevens, E. E. : Autologous bone marrow transplantation in patients with adult acute leukemia in relapse. Transplant., 26, 169-173, (1978).
- 29) Buckner, C. D., Stewart, P., Clift, R. A., Fefer, A., Nieman, P. E., Singer, J., Storb, R., & Thomas, E. D. : Treatment of blastic transformation of chronic granulocytic leukemia by chemotherapy, total body irradiation and infusion of cryopreserved autologous marrow. Exp. Hematol., 6, 96-109, (1978).
- 30) Netzel, B., Rodt, H., Lau, B., Thiel, E., Haas, R. J., Dörmer, P., & Thierfelder, S. : Transplantation of syngeneic bone marrow incubated with lymphocyte antibodies. Transplant., 26, 157-161, (1978).
- 31) Wells, J. R., Billing, R., Herzog, P., Feig, S. A., Gale, R. P., Terasaki, P., & Cline, M. J. : Autotransplantation after in vitro immunotherapy of lymphoblastic leukemia. Exp. Hematol., 7, suppl. 164-169, (1979).
- 32) Apperbaum, F. R., Herzig, G. P., Graw, R. G., Bull, M. I., Bosles, C., Gorin, N. C. & Deisseroth, A. B. : Study of cell dose and storage time on engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in a canine model. Transplant., 26, 245-248, (1978).
- 33) Spitzer, G., Verma, D. S., Fisher, R., Zander, A., Vellekoop, L., Litam, J., McCredie, K. B. & Dick, K. A. : The myeloid progenitor cell. Its value in predicting hematopoietic recovery after autologous bone marrow transplantation. Blood, 55, 317-323, (1980).
- 34) Lewis, B. J. & Devita, V. T. : Combination therapy of the lymphomas. Seminars Hemat., 15, 431-457, (1978).
- 35) McKwivey, E. M., Gottlieb, J. A. & Vilson, H. E. : Hydroxyldaunomycin (Adriamycin) combination chemotherapy in malignant lymphoma. Cancer, 38, 1484-1493, (1976).
- 36) Thomas, E. D., Buckner, C. D., Fefer, A., Sanders, J. E., & Storb, R. : Efforts to prevent recurrence of leukemia in marrow graft recipients. Transplant. Proc., 10, 163-165, (1978).
- 37) Weiner, R. S., Tobias, J. S., & Yankee, R. A. : The processing of human bone marrow for cryopreservation and reinfusion. Biomedicine, 24, 231-237, (1976).
- 38) Wells, J. R., Sullivan, A., & Cline, M. J. : A technique for the separation and cryopreservation of myeloid stem cells from human bone marrow. cryobiology, 16, 201-210, (1979).
- 39) 中村忍 : 骨髄移植の臨床経験. 臨床血液, 21, 465-471, (1980).
- 40) 塩原信太郎. 骨髄移植班 : 骨髄移植の免疫不全状態について (抄録). 日血会誌, 43, 238, (1980).

Study on Cryopreservation of the Human Bone Marrow Cell II Clinical Application of Autologous Bone Marrow Transplantation to Malignant Neoplasm Chizuko Ishino, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. *J. Juzen Med. Soc.*, 89, 825-836 (1980).

Abstract Autologous bone marrow transplantation (Auto-BMT) was applied to cure the patient with malignant neoplasms.

Materials used here were 4 patients with acute leukemia, 4 with non-Hodgkin's lymphoma (NHL) of stage III - IV and 1 with nasopharyngeal carcinoma.

In the case of leukemic patients, bone marrow was collected and cryopreserved during the first complete remission (CR). At relapses, patients were treated by intensive remission induction chemotherapy and followed by Auto-BMT. All four patients after Auto-BMT obtained CR, lasting 1.5-19 months, one of which was longer than those who did not undergo Auto-BMT, but all finally relapsed.

In the case of neoplasms with no tumor invasion to the marrow, the marrow was first collected before any kind of treatment and stored in the optimal condition. After the tumor mass was minimized by intensive chemotherapy and local irradiation, Auto-BMT was carried out in an isolated bio-clean room just after high dose cyclophosphamide (120 mg/kg) and supralethal total body irradiation (1000 rad). All of these patients showed CR without any procedure death and are surviving on days 169-417 posttransplant. However, 2 patients with NHL relapsed in 13 and 2 months after Auto-BMT.

These observations suggest that Auto-BMT is an effective tool for bone marrow rescue after supralethal radiochemotherapy. This may facilitate cure-oriented therapeutic regimens for the treatment of malignant tumor otherwise incurable by the conventional therapy.