
シンポジウム

自家骨髄移植の応用

Application of Autologous BMT to Cancer Treatment

第 482 回新潟医学会

日 時 平成 4 年 10 月 17 日 (日) 午後 2 時

会 場 新潟大学医学部 有壬記念館

司 会 森山美昭助教授 (高密度無菌治療部)

演 者 品田章二 (輸血部), 高桑好一 (産婦人科), 後藤隆夫 (第一内科), 岸 賢治 (第一内科), 鷺山和雄 (神経病理学), 西山 勉 (長岡中央病院泌尿器科), 田島知郎 (東海大外科教授), 手塚先生

司会 今日天気が良いえに日本シリーズがあって、少し観客が少ないですが、早速本日のシンポジウムに移らせて頂きたいと思ひます。ご存知のように、最近、造血幹細胞の概念の確立、細胞保存技術の進歩、更に無造血期の支持療法として、無菌室や成分輸血、更にサイトカインの臨床応用などにより、従来、化学療法 dose limiting factor であった白血球減少や血小板減少がある程度克服され、超大量の化学療法を行った後、骨髄あるいは末梢血中の幹細胞を輸注してその生命を保持するという自家骨髄移植療法が、担癌患者の根治療法のひとつとして普及してまいりました。この自家骨髄移植療法は固形癌など広く、今後応用が期待される分野ではありますが、問題がなくはありません。例えば、いかに担癌患者の腫瘍細胞を根絶するかという問題。それから自家骨髄移植固有の問題ですが、採取した骨髄あるいは末梢血細胞中に腫瘍細胞の contamination があるという問題、更には同種骨髄移植では GVHD という特有な病

態がしばしば起きて、これによる GVL 効果、すなわち残存腫瘍細胞が傷害される作用が期待できるわけですが、自家骨髄移植ではそのような作用は期待できないことなど、多々問題があります。しかし、最近新潟地区でも各科を越えてこの自家骨髄移植が試みられており、この機会にその現状や問題点を探ってみることもひとつの方向ではないかと思ひ、本日のシンポジウムを企画いたしました。本日はまた乳癌の治療の権威であられる、東海大学外科教授田島先生にも加わって頂き、ホットなディスカッションが期待できるのではないかとと思ひしております。シンポジウムの内容はこのプログラムにございますが、前半の 3 題が基礎的なもの、後半の 4 題が臨床応用となっており、各演者が発表した後に 2、3 質問を受けさせて頂き、最後全部終了した時点で時間の許す限りディスカッションしたいと思ひますので、最後までご静聴お願い申し上げます。前置きはこのくらいにして、早速シンポジウムに入らせて頂きます。

1) Ex vivo marrow purging: 熱処理による腫瘍細胞の除去とそのシミュレーション実験

新潟大学高密度無菌治療部 森山 美昭・岸 賢治
同 第一内科 後藤 隆夫・橋本 誠雄

Ex Vivo Marrow Purging by Hyperthermia:
Simulation Experiments for Autologous Bone
Marrow Transplantation.

Yoshiaki MORIYAMA, Kinji KISHI, Takao GOTO and
Shigeo HASHIMOTO

*First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine, Niigata*

In order to apply a simple purging method by heat to autologous bone marrow transplantation (ABMT), we have reevaluated the ability to purge clonogenic leukemic cells from the simulated marrow mixture of normal marrow cells and leukemic cell lines (HL60, Molt-3 and HEL) in vitro by heat, using two different clonogenic assays for normal granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM) and leukemic cell lines. The cytotoxic effect of cryopreservation on heat-treated normal marrow cells in vitro was also examined. It appeared that in vitro hyperthermia (42°C for 120 min) is able to selectively remove clonogenic leukemic cells from simulated tumor cell-normal marrow mixtures even when leukemic cell concentrations are increased up to 3×10^6 cells/ml in vitro, and results in a 4-to-6 log destruction of clonogenic leukemic cells/ml according to a limiting dilution assay, while leaving half of normal CFU-GM surviving. The hyperthermic purging of clonogenic leukemic cells was not affected in the presence of normal marrow cells in vitro. This high level of clonogenic leukemic cell depletion by heat correlated with that of immunologic and pharmacologic studies. In addition, treatment of normal or remission marrow cells with hyperthermia did not significantly change the growth of CFU-GM after cryopreservation, and the percentage recovery of CFU-GM ranged from 34 to 79 %. These results suggest that in vitro hyperthermia could be applied effectively and safely for the elimination of residual clonogenic leukemic cells in autologous marrow grafts before ABMT.

Key words: Hyperthermia, Ex vivo purging, clonogenic tumor cell, limiting dilution assay, cryopreservation

温熱療法, 生体外腫瘍細胞の除去, 限界希釈法, 凍結保存

Reprint requests to: Yoshiaki MORIYAMA,
First Department of Internal Medicine,
Niigata University, School of Medicine,
Asahimachi-dori, Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町757
新潟大学高密度無菌治療部 森山美昭

はじめに

自家骨髄移植 (BMT) 療法は固型癌を含め、悪性腫瘍の根治療法として普及しつつあるが、特に血液疾患では自家 BMT 後の最大の問題は再発である。その要因の第一は、host の残存腫瘍 (minimal residual disease, MRD) と、第二は自家 BMT 用に採取した骨髄細胞 (末梢血) 中に混入する腫瘍細胞である。前者は同種 BMT も直面している問題であるが、一方、後者は自家 BMT 固有の問題である。

自家 BMT 前に、混入腫瘍細胞を除去 (purging) することが、その後の再発や予後に重要であることが、最近、臨床的に証明され¹⁾²⁾、混入腫瘍細胞のいわゆる生体外除去 (ex vivo purging) について種々の方法が検討されている³⁾。

私共は白血病幹細胞が熱に極めて弱いことを見出し⁴⁾、温熱による marrow purging を試み⁵⁾⁻¹¹⁾、臨床的に安全に応用しようことを確認¹²⁾しているが、今回、正常骨髄細胞中にどの程度白血病細胞が混入していた場合、温熱処理で除去できるか否かシミュレーション実験を行った。

方 法

1) 白血病細胞株：2種の骨髄系細胞株 (HEL と HL-60) と Tリンパ芽球系 (Molt-3) を用いた。

2) 白血病細胞と正常骨髄細胞の混合：あらかじめ 4,000 cGy 照射した正常骨髄細胞 (MNC: 10^7 個/ml) に白血病細胞 5×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 および 5×10^6 /ml (即ち 20:1, 10:1, 10:3, 10:5 の比) を混合し、血清を含まない RPMI-1640 液⁶⁾ に浮遊し、42°C の恒温槽 (± 0.1 °C) で 0~120 分間加温した。

3) Limiting dilution assay: 熱処理後、各サンプルを連続的に 5×10^6 から 0.5 細胞まで 10 倍希釈し、10% FBS 加 PRMI-1640 液 100 μ l を 96 穴の microculture well に移し、14 日間 37°C で培養した。培養液は 3~4 日毎に交換した。そして細胞増殖がどの希釈系列で認められないか否か (all-or-nothing)、倒立顕微鏡で判定した¹³⁾。

4) ヒト CFU-GM assay: 正常ヒト骨髄中の顆粒球-マクロファージ系前駆細胞 (CFU-GM) は既報⁵⁾⁹⁾の軟寒天法で、コロニー刺激因子 GM-CSF 100 ng/ml 添加し測定した。

5) 細胞の凍結・解凍: 熱処理後の正常および寛解例の骨髄細胞を既報のごとく¹²⁾、10% FBS および 10%

DMSO 加 RPMI-1640 液で -196°C に保存し、解凍後の CFU-GM の生存率と細胞の回収率を検討した。

成 績

図 1 は、白血病細胞株 (HEL, Molt-3, HL-60) と正常 CFU-GM の 42°C 加温による殺細胞効果を比較したものであるが、正常 CFU-GM は、42°C 120 分の加温で 0.4 log 程度しか減少しないのに対し、白血病細胞は 4~6 log と著しく減少した。白血病細胞株の熱感受性は HL-60 > Molt-3 > HEL の順であった。

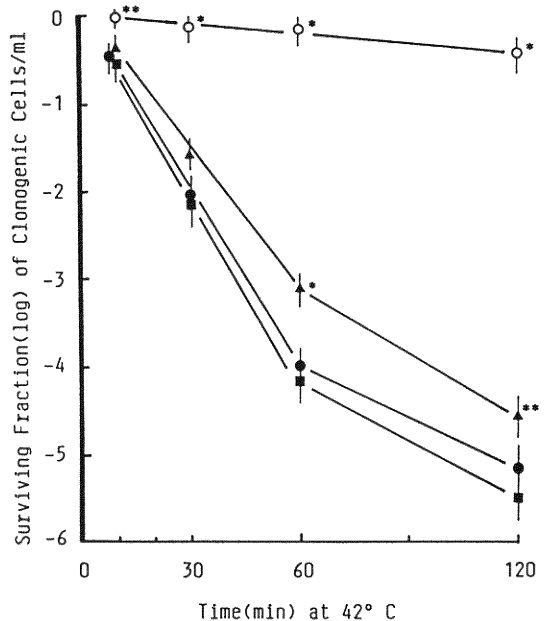


Fig. 1 A comparison between the thermal sensitivity of normal CFU-GM (○) and clonogenic HEL (▲), Molt-3 (●) and HL60 (■) cells in vitro at 42°C. The survival of CFU-GM was estimated as the ratio of colony counts at each point to the count at 0 time. The growth of clonogenic leukemic cell lines was assayed according to a limiting dilution assay to measure log depletion of tumor cells in vitro. Bars (n=6), SD: number of colonies at room temperature (controls): CFU-GM, $164 \pm 30 / 1 \times 10^5$ MNC. Significant difference between CFU-GM and all leukemic cell lines at all temperatures studied, and between HEL cells and HL60 cells, respectively. * p < 0.001, ** p < 0.005.

更に、熱処理 (42°C) で白血病細胞がどの程度正常骨髄細胞に含まれていても除去しうるかを検討した。図 2 は正常骨髄 MNC (irradiated) と HL60 の混合 (1:0, 20:1, 10:1, 10:3, および 10:5 の各比) 実験であるが、HL60 は、正常骨髄細胞の存在に影響されず、加温と共に減少 (4~6 log) した。一方、正常 CFU-GM は、HL-60 細胞 (irradiated) を 10:3 まで混合しても、有意の減少は認められなかったが、10:5 以上の混合で

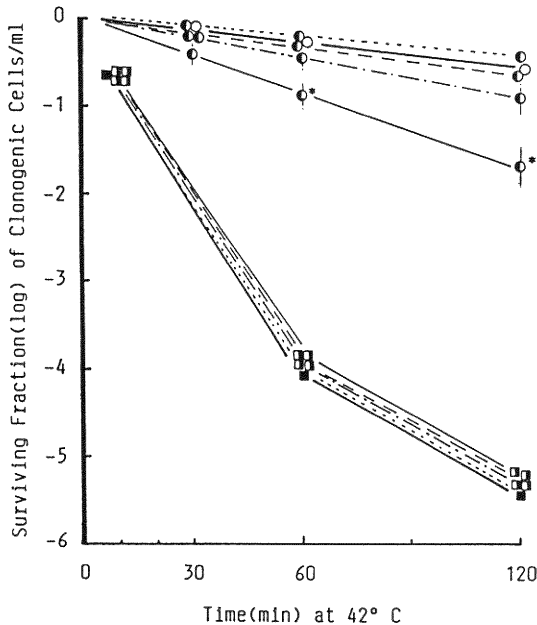


Fig. 2 Elimination of clonogenic HL60 cells (■) from simulated marrow cell mixtures (●, □) in vitro by heat exposure at 42°C for 120 min. Clonogenic HL60 cells ($0, 5 \times 10^5, 10^6, 3 \times 10^6$ and 5×10^6 /ml) were added to irradiated normal marrow cells (10^7 /ml) and cultured in vitro after heat exposure for a limiting dilution assay (■), whereas irradiated HL60 cells ($0, 5 \times 10^5, 10^6, 3 \times 10^6$ and 5×10^6 /ml) were also added to normal marrow cells and prepared for the CFU-GM assay (●). Bars ($n=5$), SD. —○—, normal marrow cells alone; —■—, HL60 cells alone; ·····, normal and HL60 cell mixture (20:1); - - -, normal and HL60 cell mixture (10:1); —●—, normal and HL60 cell mixture (10:3); —■—, normal and HL60 cell mixture (10:5), respectively. * Significantly ($p < 0.005$) reduced as compared with normal marrow cells alone.

は有意 ($p < 0.005$) に減少した。同様の影響が Molt-3 および HEL でも観察された (成績省略)¹⁴⁾。なお、4,000 cGy 照射によって、いずれの細胞もコロニー形成能を消失した。

表 1 は、正常および寛解例の骨髄細胞を熱処理 (42°C, 60~120 分) し、凍結保存し、その後解凍して、正常 CFU-GM の生存率と全 MNC の回収率を検討したものである。凍結・解凍、洗浄などの操作により、全細胞数として約 34% 失ったものの、CFU-GM は全例で生存がみられ、その回収率は 34~79% であった。

考 察

最近、Gorin ら¹⁾ は AML (mafosfamide 処理) で、また Gribben ら²⁾ は B-細胞リンパ腫 (モノクローナル抗体+補体処理) で、自家 BMT における ex vivo purging の重要性を指摘している。腫瘍細胞の生体外除去には、種々の方法が考察されているが³⁾、実際に臨床応用された方法に、モノクローナル抗体処理、各種抗腫瘍剤による処理、長期培養法、CD34 陽性細胞などの positive selection、さらに私共が開発した熱処理法などである。

熱処理 (hyperthermia) による purging は極めて簡便であるのみならず、腫瘍細胞の除去効果は、42°C, 60~120 分の加温で、ml 当り 4~6 log で、Gribben ら²⁾ のモノクローナル抗体と補体処理 (3 cycles) や複数の抗腫瘍剤処理による成績に匹敵するものである。今回、正常骨髄細胞に白血病細胞を混合し、寛解時や再発時の骨髄を想定したシミュレーション実験でも、4~6 log の腫瘍細胞の除去が期待され、かつ抗腫瘍効果は正常骨髄細胞の存在下でも影響されなかった。しかし、多量の白血病細胞の混入 (10:5, 又は 5×10^6 個/ml) は正常 CFU-GM に影響を与え、それを有意に抑制した。従って、熱処理のみによる purging の限界は、正常骨髄細胞:腫瘍細胞の比が 10:5 程度と考えられる¹⁴⁾。

一方、熱処理された造血幹細胞は凍結保存や解凍で障害される可能もあり、正常および寛解例の CFU-GM に対する凍結・解凍の影響を検討したが、凍結、解凍、さらに洗浄の過程で、全 MNC として約 34% 程度失ったものの、CFU-GM の回収率は 34~79% で、実際の自家 BMT では、全例造血の回復が観察されている。最近、私共の熱処理による purging 法を追試した Herrmann らの報告¹⁵⁾でも、CFU-GM の回収率は 80% 以上であり、熱処理による purging の安全性が確認されている。

以上、熱処理による purging で、白血病細胞のみな

Table 1 Effect of heat exposure (42°C for 60~120 min) and cryopreservation on colony forming ability and survival of CFU-GM in normal and remission marrow cells.

Patients* at remission	FAB diagnosis	Before cryopreservation	Duration of strage (months)	After Cryopreservation		
		CFU-GM per 10 ⁵ MNC		TMNC recovery(%)	CFU-GM per 10 ⁵ MNC	% recovery** of CFU-GM
E.K.	M 2	78	2.0	52.0	52	34.6
H.S.	M 1	56	3.5	83.0	53	78.6
Y.W.	M 1	130	6.0	74.6	83	47.6
H.T. #	M 2	44	6.0	46.1	36	37.7
K.H.	L 2	106	9.0	58.9	98	54.4
Y.S. §	L 2	81	42.0	76.4	63	59.4
Normal (n=4) (range)	(mean±SD)	98±23	3.2 (1-6)	65.4 (50-81)	89±19	60.2 (39-80)

Abbreviation: FAB, French-American-British.

TMNC, total marrow mononuclear cells.

* All marrow cells treated with hyperthermia (42°C) were cultured before and after cryopreservation.

** (Number of CFU-GM (10⁵ MNC) after cryopreservation/number of CFU-GM (10⁵ MNC) before cryopreservation) × % TMNC recovery.

Remission marrow cells treated with combined hyperthermia (42°C) and procaine HCl (2mM) before cryopreservation

§ Remission marrow cells treated with combined hyperthermia (42°C) and interferon-α (100 U/ml) before cryopreservation.

らず、B-cell lymphoma を含め¹¹⁾¹⁶⁾、ml 当り 4~6 log 程度除去することが可能である。さらに、今回のシミュレーション実験から、例え、30%程度腫瘍細胞が混入していても、その purging が期待された。

おわりに

温熱処理は操作が簡単で、経済的であり、また正常造血幹細胞の障害も軽度 (0.4 log 程度) で、かつ変異原性や発癌性もないといわれ、安全に臨床応用できるものと考えられる。

参考文献

- 1) Gorin, N.C., et al.: Leukemia, 5: 894, 1991.
- 2) Gribben, J.G., et al.: New Engl J Med, 325: 1255, 1991.
- 3) 森山 美昭: 今日の移植., 4(suppl. 1): 94, 1991.
- 4) Moriyama, Y., et al.: Blood, 67: 802, 1986.
- 5) Moriyama, Y., et al.: Bone Marrow Transplant, 6: 243, 1990.
- 6) Moriyama, Y., et al.: Exp Hematol, 18: 1056, 1991.
- 7) Moriyama, Y., et al.: Leukemia, 5: 90, 1991.
- 8) Moriyama, Y., et al.: Leukemia, 5: 332, 1991.
- 9) Moriyama, Y., et al.: Bone Marrow Transplant, 8: 301, 1991.
- 10) Moriyama, Y. and Endo, K.: Exp Hematol, 20: 347, 1992.
- 11) Moriyama, Y., et al.: Ann Hematol, 64: 266, 1992.
- 12) Higuchi, W., Moriyama, Y., et al.: Bone Marrow Transplant, 7: 163, 1991.
- 13) Roy, D.C., et al.: Leuk Res, 14: 407, 1990.
- 14) Moriyama, Y., et al.: Leuk Res, 16: 973, 1992.
- 15) Herrmann, R.P., et al.: Bone Marrow Transplant, 10: 293, 1992.
- 16) Moriyama, Y., et al.: Bone Marrow Transplant, 1992 (in press).

司会 質問ございませんでしょうか。ないようですので次に移らせて頂きます。第2席め、「輸液幹細胞の凍結・保存」ということで、品田先生、お願いします。