

慢性骨髓性白血病におけるインターフェロン- α
 添加骨髓長期培養による Ph¹ 陽性クローンの
 選択的除去と自家骨髓移植への応用

新潟大学第一内科学教室 (主任: 柴田 昭教授)

成 田 美和子

Purging of Ph¹ Positive Cells in CML by a Combination with Long
 Term Marrow Culture and Interferon- α and its Application
 to Autologous Bone Marrow Transplantation

Miwako NARITA

*The 1st Department of Internal Medicine, Niigata
 University School of Medicine
 (Director: Prof. Akira SHIBATA)*

For the treatment of CML, bone marrow transplantation is thought to be the only method that consistently restores normal hematopoiesis for long period. However, the indication of allogeneic marrow transplantation is restricted to a small number of patients with CML. As functionally competent Ph¹ negative hematopoietic stem cells are now known to persist in CML, autologous marrow transplantation might be undertaken with curative intent if clonogenic malignant (Ph¹ positive) stem cells could be eliminated from the autograft. For the purpose of developing a effective method to purge Ph¹ positive stem cells, we tried long term CML marrow culture in combination with IFN- α that is clinically established as a drug to inhibit the proliferation of Ph¹ positive cells. The long term culture in the presence of IFN- α (10~10³ IU/ml) was found to eradicate Ph¹ positive CFU-GM derived colony forming cells in all CML patients in time and dose dependent manner. The effects of IFN- α to the microenvironment and to Ph¹ positive cells are still not so well analysed, but our results suggest that Ph¹ negative CFU-GM are more tolerable than Ph¹ positive ones in long term culture system with IFN- α . Thus, this culture system might be useful method to purging malignant (Ph¹ positive) clone for autologous marrow transplantation in patients with CML.

Key words: autologous bone marrow transplantation, interferon- α : INF- α , long
 term marrow culture: LTMC, chronic myelogenous leukemia: CML
 自家骨髓移植, インターフェロン- α , 骨髓長期培養, 慢性骨髓性白血病

Reprint requests to: Miwako NARITA,

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
 新潟大学第一内科学教室

成田美和子

はじめに

慢性骨髄性白血病（以下 CML と略す）は Ph¹ 染色体を有する clonal hemopathy¹⁾ で、近年、分子生物学的手法により、c-abl sequence を有する第 9 染色体の断端が、第 22 染色体のいわゆる break point cluster region (bcr) に転座していることが明らかにされた²⁾。更に急性転化の機序についても、N-ras 遺伝子の活性化など、新しい展開がみられる。しかし一方、臨床的には急性転化は防止できず、本症の生命予後の本質的な改善は、同種骨髄移植以外には未だ認められず、依然として予後不良な疾患である。

現在、CML の根治療法として、第一選択は同種骨髄移植と考えられる³⁾ が、HLA の一致した donor の選定、年齢など、著しく制約があり、その適応拡大には自家骨髄移植の応用が有用と思われる。しかし、自家骨髄移植のためには、骨髄中の Ph¹ クローンを選択的に除去する手段が必須である。1986 年、Talpa⁴⁾ らは、24 例の CML 患者に interferon- α (IFN- α) を投与し、7 例に Ph¹ 陰性 clone の出現を認め、CML の根治の可能性を示す治療法として、IFN- α がにわかに注目された。本邦でも、CML に対する IFN- α (HLBI) の検討が多施設の共同研究で行われ⁵⁾、一部の症例で Ph¹ クローンの減少、または陰性化、さらに bcr rearrangement の消失が確認された。しかし、CML の IFN- α に対する感受性は症例間に差があり、かつ IFN- α の使用でも急性転化への移行を阻止することは不可能な症例が存在することなど、根治療法としての IFN- α の投与には、さらに工夫が必要である。今回、著者は CML の根治療法、特に CML の自家骨髄移植の応用を目的に、1983 年に報告された Colombel ら⁶⁾ による CML 骨髄細胞の長期培養 (long term marrow culture: LTMC) で Ph¹ 陽性クローンが減少するという成績をもとに、これに Ph¹ 陽性クローン増殖抑制作用を有する IFN- α を併用することによって、Ph¹ 陽性クロー

ンを in vitro で選択的に除去可能か否か検討を加えた。その結果、CML の LTMC に IFN- α を併用することによって、浮遊細胞中の CFU-GM 由来の Ph¹ 陽性細胞は、IFN- α で濃度依存性に減少することを確認したので、その成績と今後の展望と自家骨髄移植への応用に対する問題点を含め報告する。

対象と方法

《骨髄細胞》CML 慢性期患者 5 例の骨髄 buffy coat を使用した。症例の内訳は表 1 に示す。症例 1 は、hydroxyurea にて治療中であり、症例 5 は既に INF- α 使用にて骨髄中の Ph¹ 陽性細胞は 50% に減少していた。症例 2 と 3 には、後に同種骨髄移植が施行された。

《interferon- α : INF- α 》天然型 IFN- α (human lymphoblastoid interferon: HLBI, specific activity of) 1×10^8 IU/mg protein: SUNITOMO Pharmaceutical Co. Tokyo Japan) を使用した。

《骨髄長期培養 long term marrow culture: LTMC》LTMC は、Dexter ら⁷⁾ の培養系を修正した Gartner & Kaplan⁸⁾ の方法に準じて行った。

2×10^7 個の骨髄 buffy coat を 10ml の培養液に浮遊させ、25cm TC flask で 37°C 5% CO₂ の条件下で培養し、7日ごとにその半量を新しい培養液と置換した。培養液としては McCoy's 5A medium に 12.5% horse serum, 12.5% fetal calf serum, 10^{-6} M hydrocortison, 各種 vitamin, amino acid を加えたものを使用した。各症例とも、IFN- α を添加しない培養系を control とし、IFN- α 終濃度 10 IU/ml, 10^2 IU/ml, 10^3 IU/ml 添加の培養を行った (図 1)。

7日ごとに flask より取り出した半量の培養液中の浮遊細胞は、細胞数を計測した後、CFU-GM assay に使用した。一部の培養系では、この浮遊細胞の染色体分析も行った。

《CFU-GM assay》教室の岸の establish した CSF 産生腫瘍 (SPT-2) の conditioned medium を GM-CSF

表 1 LTMC を施行した CML 慢性期患者の内訳

Case	Age	Sex	% of Ph positive BM cells	Therapy befor LTMC	Therapy after LTMC
1	22	F	100%	hydroxyurea	hydroxyurea
2	23	F	100%	(-)	BMT
3	17	M	100%	(-)	BMT
4	22	F	100%	(-)	IFN hydroxyurea
5	63	F	50%	IFN	IFN

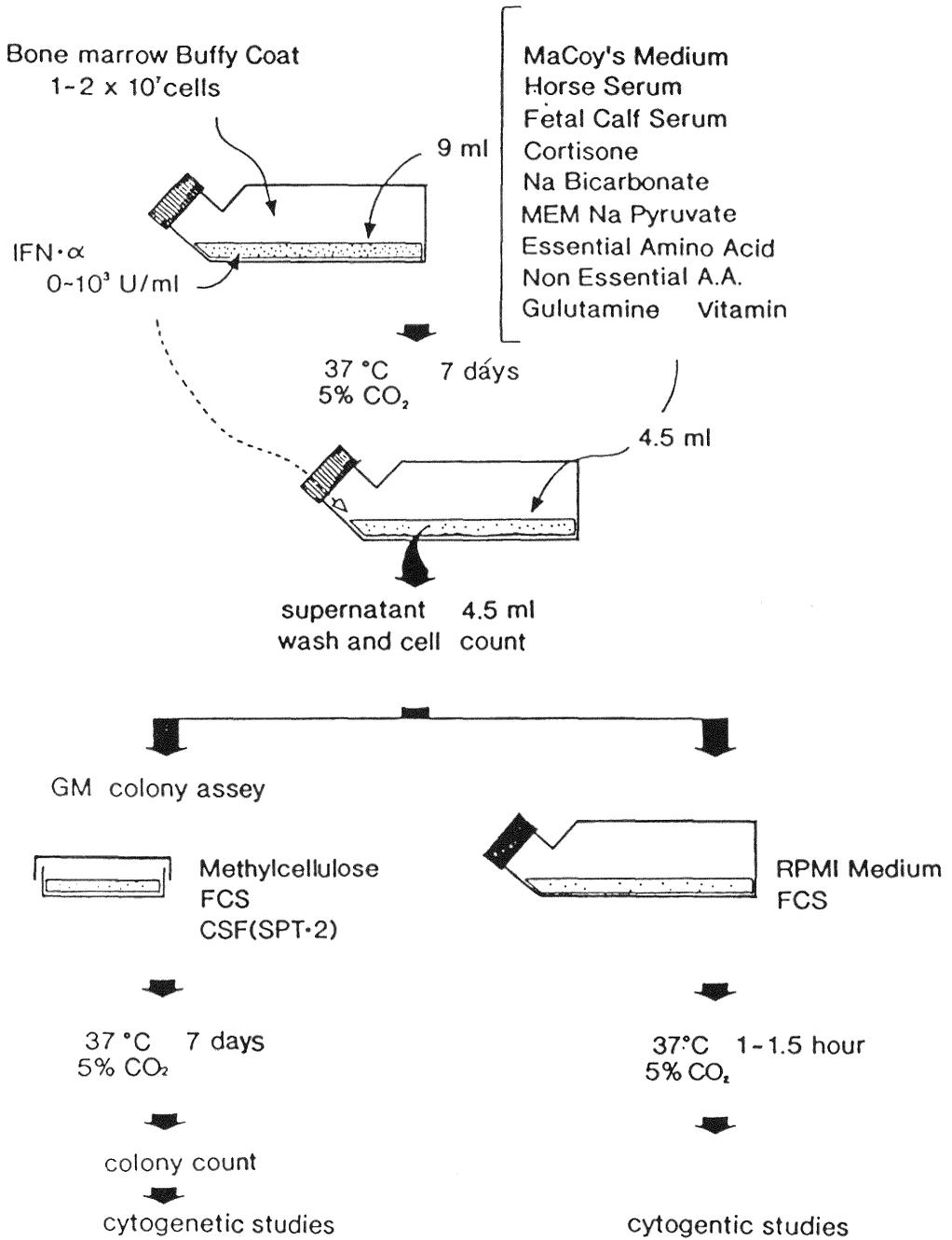


図1 培養方法と染色体分析方法

source として使用し, methylcellulose 法で行った. RPMI medium で洗浄した 1×10^5 個の LTMC 浮遊細胞を, 0.8% methylcellulose と 15% SPT-2 conditioned medium を含む MaCoy's 5A medium に浮遊させ, 35cmm culture dish に移し, 37°C 5% CO₂ の条件で 7日間培養した. colony assay の際には, IFN- α 添加 LTMC 由来の細胞に対しても IFN- α は添加しなかった. 7日目に倒立顕微鏡にて40個以上の細胞集団を colony としてその数を計測した.

《染色体分析》colony 数計測後の dish に, colcemid を溶解した RPMI medium 2ml を速やかに加え攪はんし, 約1時間, 37°C 5% CO₂ で培養した. colcemid の終濃度は, 0.015 μ g/ml となるように調節した. 一部の培養系では, 以下の方法で colony assay の前の浮遊細胞の染色体分析も行った. すなわち, LTMC より取り出した浮遊細胞を10% fetal calf serum を含んだ RPMI medium に浮遊させ, 37°C 5% CO₂ で約24時間培養し, その後 colcemid を加え, さらに1時間培養した.

colcemid 添加にて培養後の細胞は, 0.075 MKCI solution で低張処理を行い, Carnoy's solution (methanol:acetic acid=3:1) で3回の固定処理を行った. 固定した細胞は, hoechst 33258 と quinacrine mustard にて二重染色 (Q-banding method) を施行し, 蛍光顕微鏡下で分裂像を撮影し解析を行った.

Ph¹ 陽性細胞の消長は一週ごとに施行した染色体分析の結果をもとに, 全分裂細胞中の Ph¹ 陽性細胞の割合 (%) で評価した. 症例1から4は培養開始時は 100% Ph¹ 陽性であり, 症例5は Ph¹ 50%陽性の時点から培養を開始した.

結 果

I. LTMC による stromal cell layer の形成

慢性期骨髄細胞からは, 治療の有無にかかわらず, 1~2週目には良好な marrow stromal cell layer の形成が認められ, 全症例とも, 最低4週間の LTMC を維持することが可能であった. また IFN- α を添加した培養系の marrow stromal cell layer も, その形態は, 光顕的には control (IFN- α 非添加) のそれと差は認められなかった.

II. LTMC による浮遊細胞の変化

a. LTMC 上清中の浮遊細胞数は, 図2に示すごとく, 一週ごとに急速に減少した. 減少の程度は, IFN- α 添加培養系でさらに強く, IFN- α 濃度に依存する傾向が認められた. 殊に, IFN- α 10³ IU/ml の培養系では, 浮遊細胞は培養開始時の 1/100~1/1000 の細胞数 (10⁴ 個 level) しか回収できなかった. これら浮遊細胞は, 3~4週目には, lymphocyte と macrophage がその大半を占め, granulocyte の割合は次第に減少した.

b. LTMC 上清中の浮遊細胞 1×10^5 個あたりの CFU-

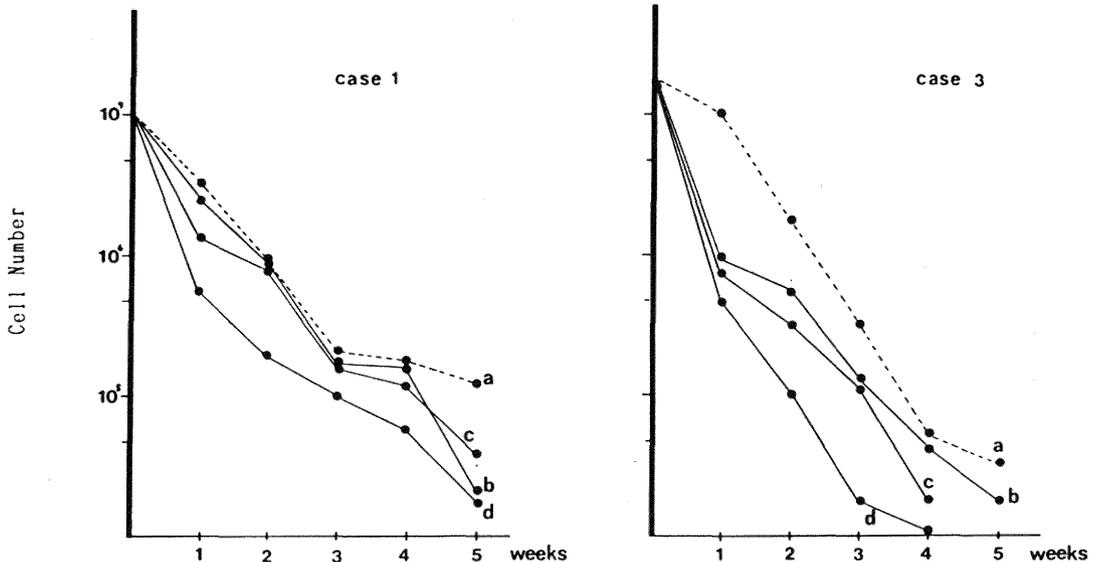


図2 LTMC 上清中の浮遊細胞数の経時的変化 (case 1, 3)

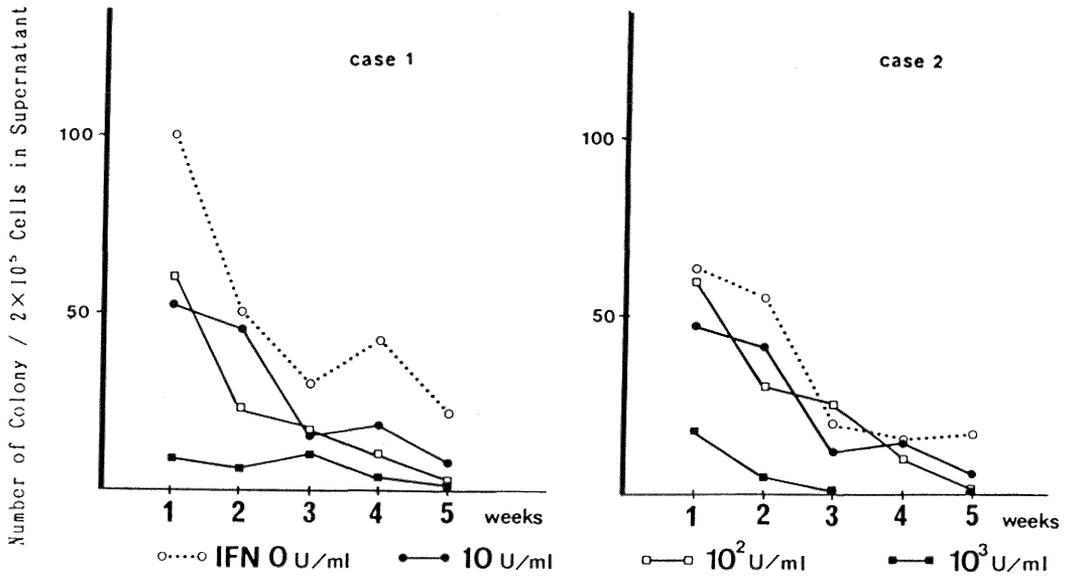


図3 LTMC 上清浮遊細胞中の CFU-GM 由来 colony 数の経時的变化 (case 1, 2)

GM 由来 colony 数も、同様に一週ごとに減少し、これは IFN- α 10^3 IU/ml の濃度下で最も著明であった (図 3)。

III. LTMC と IFN- α による Ph^I 陽性細胞の purging 効果

a. Ph^I 陽性細胞の消失効果については、浮遊細胞中の CFU-GM 由来の colony 形成細胞で検討した

(図 4). IFN- α 非添加培養系 (control: a) においても、症例 1, 3, 4 では 3~4 週目に 8~25% の Ph^I 陰性細胞の出現を認めたが、症例 2 では Ph^I 陰性細胞の出現を認めることはできなかった。

b. IFN- α 添加培養系では、その濃度依存性に Ph^I 陽性細胞が消失する傾向が確認された (図4-b, c, d). 殊に IFN- α 濃度が 10^3 IU/ml の場合は、1~2 週目

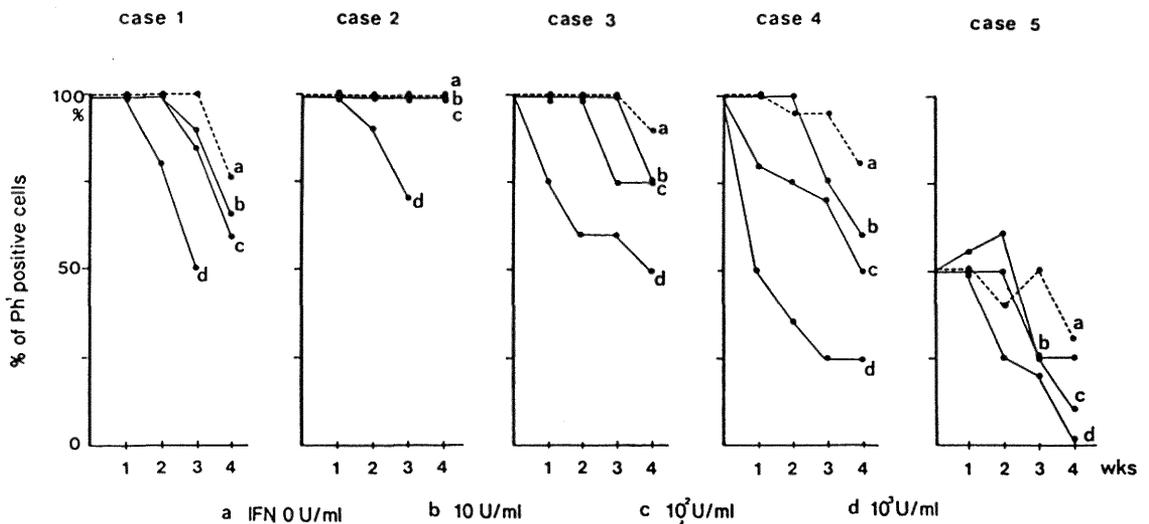


図4 LTMC 上清浮遊細胞中の CFU-GM 由来 colony 形成細胞の Ph^I 陽性の経時的变化 (case 1~5)

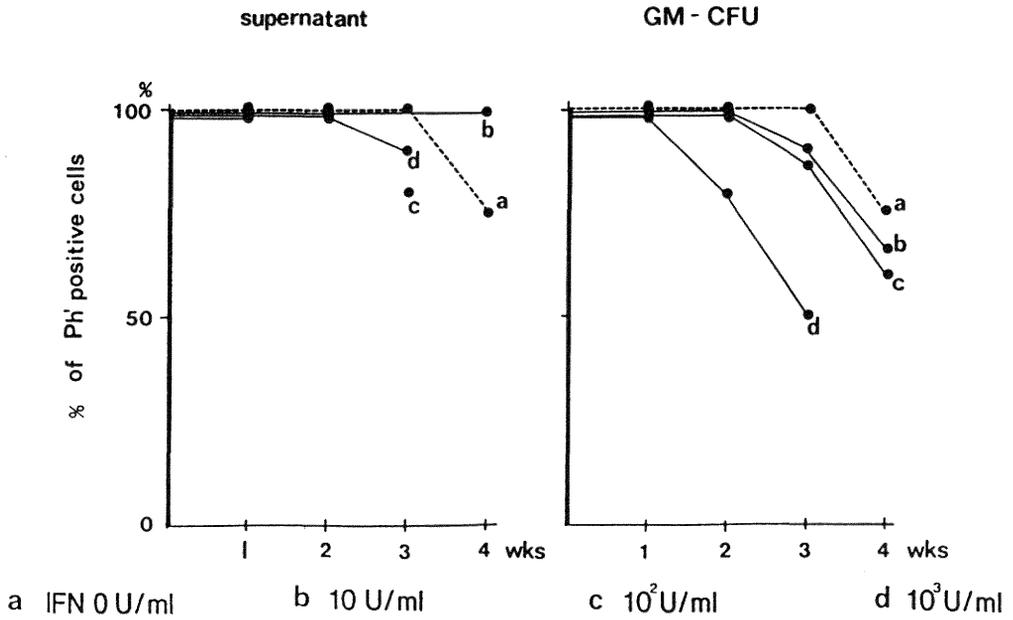


図 5 LTM 上清浮遊細胞と浮遊細胞中の CFU-GM 由来 colony 形成細胞の Ph¹ 陽性率の比較 (case 1)

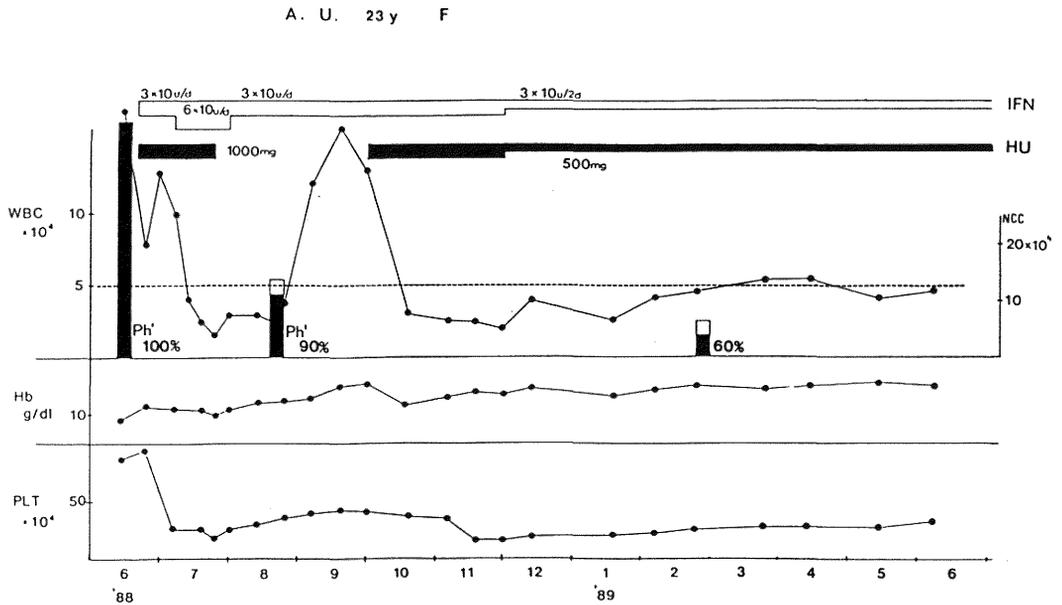


図 6 case 4 の臨床経過

より急速に Ph¹ 陽性細胞が減少し、陰性細胞が50%以上の割合を占めるようになった。症例5は IFN- α にて治療を開始されており、培養開始時には既にその骨髓細胞中50%が Ph¹ 陰性細胞に置き代わっていたが、さらに IFN- α を加えて培養を続けることにより、4週目には Ph¹ 陽性細胞が100%消失した。症例2は IFN- α 10³ IU/ml 添加培養系では、4週目に解析に足る分裂細胞数(10個以上)を回収することが不可能であったため、消失率は表示していない。

c. 大量の細胞を培養することが可能であった症例1においては、LTMC 上清中の浮遊細胞の Ph¹ 陽性細胞の消失率と、その浮遊細胞中の CFU-GM 由来 colony を形成する細胞の消失率を比較した(図5)。浮遊細胞においても、3~4週目には Ph¹ 陰性細胞の出現を認めたが、colony 形成細胞(CFU-GM)に対する抑制がより著明であった。

IV. 臨床例における Ph¹ 陽性細胞の減少と in vitro での抑制効果の比較

LTMC で IFN- α の感受性を検討した症例のうち、3例(症例2, 4, 5)に実際に IFN- α が投与されたので、in vitro と in vivo の関係を比較した。症例2は骨髓移植の前に IFN- α にて白血球数の調整を試みたが効果不十分のため他剤の併用が必要であった。症例4は、この後、臨床的にも IFN- α 長期投与を行い、投与開始3ヶ月目に早くも Ph¹ 陰性細胞の出現を認めた(図6)。また、症例5においては通常連日投与の IFN- α を、1~2週に一度の投与で、50%以上の Ph¹ 陰性細胞の出現を得ており、症例4と同様に IFN- α の臨床的効果(Ph¹ 陽性クローンの減少)と LTMC における Ph¹ 陽性細胞減少との間には相関を有する傾向が観察された。

考 察

CML の治療、特に慢性期の治療は、従来より、busulfan, dibromomannitol などが第一選択剤であるが、その予後は無治療時代に比して本質的には改善されていない。1982年、Bolin ら⁹⁾ は、hydroxyurea が busulfan に勝ることを報告し、私たちもその追試を試みているが¹⁰⁾、bysulfan よりも生存期間は延長するものの、急性転化を防止することは困難であることが判明しつつある。一方、慢性期早期に強力な化学療法を施行すると、一過性に Ph¹ 陰性クローンが出現するという事実も知られており¹¹⁾⁻¹⁴⁾ Singer ら¹⁵⁾ は、黒人女性で G6PD hetero の CML 患者を用いて、この一過性に出現する Ph¹ 陰

性細胞は non-clonal であることを証明している。しかし従来の慢性期の治療法では、Ph¹ 陽性クローンのみ選択的に抑制し、僅かに存在するこの Ph¹ 陰性(正常)クローンを増加させることは不可能であった。CML の根治を期待できる治療法は、現在のところ同種骨髓移植のみである³⁾。当教室でも、CML の同種骨髓移植成績は、慢性期に行った全例(6例)、急性転化時に行った8例中2例が生存中であり、慢性期では、donor がいる場合は、同種骨髓移植が治療の第一選択と考えられる。しかし、同種骨髓移植には、HLA の一致した donor、年齢などの制約があり、その対象は10%以下といわれている¹⁶⁾。移植対象の拡大には、自家骨髓移植の開発が最も実用的と考えられる。

一方、抗ウイルス剤として登場した IFN は、抗腫瘍剤としての作用も有することが知られ¹⁷⁾、CML に対する臨床的有効性は、1986年、Talpoz ら¹⁸⁾ が初めて報告して以来、各施設で検討、再認識されつつある¹⁹⁾⁻²¹⁾。特に IFN- α 長期投与によって Ph¹ 陰性のクローンの出現を認めたという Talpoz ら¹⁶⁾ の報告は、単剤治療で初めて持続的 Ph¹ 陽性クローンの増殖抑制、すなわち CML の根治が期待されるという画期的報告であり、本邦でも、1986年より多施設共同で47例の CML 患者に IFN- α (HLBI) の投与を開始し、1988年までに染色体分析が可能であった症例のうち13例の Ph¹ 陰性クローンの出現を確認している⁵⁾。しかし、IFN- α による Ph¹ 陽性クローン抑制効果には個人差があり、また、従来の治療法に比して、発熱、食欲不振、全身倦怠感などの副作用も強く、CML の根治療法として確立されるには、Ph¹ 陽性クローンに対する感受性の増強、他の薬剤との併用、副作用の軽減など、今後の課題も大きい。

自家骨髓移植は donor を必要とせず、移植後の GVHD を始めとする種々の合併症の問題も少なく、さらに対象年齢の拡大など、その適応は飛躍的に増大することが期待されるが、Ph¹ 陽性クローンの purging 手段が問題となる。CML においては、Ph¹ 陽性を除去するための有効な方法が開発されず、実際、purging なしで、慢性期の細胞を集めた移植が一時盛んに行われたが、殆どの症例が再発し、効果は上がらなかった。現在、自家骨髓移植の purging 法としては、monoclonal 抗体²²⁾、4HC (4-hydroperoxycyclophosphamide)²³⁾、さらには hyperthermia 処理²⁴⁾²⁵⁾ など種々の方法が試みられているが、一長一短を有しその有用にはさらに改良が必要である。しかもこれらの purging 法は、正常細胞に混入していると考えられる僅かの病的(白血病)細胞を

除去する手段であり、急性白血病の寛解期の骨髄細胞を処理対象とする場合には除去率もかなり期待されるが、CMLのように、Ph¹ 陽性クローン以外にいわゆる正常クローンが極めて少ない状態では、purging そのものが困難と思われていた。

一般に、造血は、幹細胞とそれに対する造血微小環境 (microenvironment) の関与によって行われる。骨髄長期培養 (LTMC) は、1976年 Dexter ら⁷⁾ によって開発されたもので、この培養系で形成される marrow stromal cell layer は microenvironment に酷似し、造血に関する physiological condition を最もよく反映する培養系として確立されてきている⁸⁾²⁶⁾²⁷⁾。1983年、Colombel ら⁶⁾ は CML 慢性期患者にこの LTMC を試み、その結果、正常骨髄の培養系に比べ短期間ではあるが、4~8週間の培養を維持することが可能であり、加えて2~3週目より培養上清中の浮遊細胞の中に、Ph¹ 陰性細胞が出現してくる場合があることを報告した。1986年、Frassoni ら²⁸⁾ は、HLA の一致した性の異なる正常細胞と CML 骨髄細胞を、LTMC 系で coculture し、Ph¹ 陽性細胞が急速に減少することと、性染色体分析から、増加した Ph¹ 陰性細胞には正常骨髄細胞由来のものほかに CML 細胞由来のものがあることを証明し、LTMC という条件下では Ph¹ 陰性クローンのほうがより強い growth advantage を有することを証明した。

今回、著者は、これらの LTMC の成績をもとに、Ph¹ 陽性クローンに感受性を示す IFN- α を併用することにより、より効率よく Ph¹ 陽性クローンを選択除去できるものと考え、5例の CML 慢性期患者を対象とし、LTMC に IFN- α 10~10³ IU/m を添加し、Ph¹ 陽性クローンの消失を非添加群を対照として比較検討した。その結果、Colombel らが指摘したごとく、LTMC 単独でも Ph¹ 陽性クローンは減少するが、その減少率は低く、4週間の培養では Ph¹ 陽性クローンの 100% 除去は困難と考えられた。ところが、IFN- α を併用することにより、全例に Ph¹ 陽性クローンの減少が認められ、しかも INF- α の濃度依存性に減少する傾向が認められた。中でも、in vivo で INF- α に感受性を示した症例5では IFN- α 10³ IU/ml の添加で Ph¹ 陽性クローンは完全に消失した。このような LTMC と IFN- α による Ph¹ 陽性クローンの選択的抑制効果については、①直接的に Ph¹ 陽性細胞の増殖を抑制する薬剤 (IFN- α) の存在下では、正常 (Ph¹ 陰性) クローンがより強い増殖能力を有する、② IFN- α が narrow stromal cell

layer に作用し他の factor と共に CFU-GM またはそれ以前の段階で Ph¹ 陽性のクローンの増殖を抑制するという二通りの機序が想定される。いずれにせよ、これらの成績は LTMC と IFN- α の併用で Ph¹ 陽性クローンを purging することが可能であることを強く示唆している。

実際、Chang & Dexter ら²⁹⁾ は最近、CML のみならず急性白血病においても LTMC では病的クローンに代わって正常クローンが台頭するという Colombel ら³⁰⁾ の報告を参考に、急性骨髄性白血病患者 8 例の寛解期骨髄細胞を、LTMC で purging した後、1.0~3.8 $\times 10^8$ 個/kg を用いて自家骨髄移植を行い、第一寛解期に施行した全例にその成功を確認している。さらに、本年、Bennett ら³¹⁾ は CML 慢性期の骨髄細胞を 10 日間 LTMC し、浮遊細胞を用いた自家骨髄移植を実際 3 症例施行し、移植後最長 7 カ月間は Ph¹ 陽性細胞の出現を認めなかったことを報告している。しかし、移植に足る細胞数を得るためには 10 日間の培養が限度であり、Ph¹ 陽性細胞を完全に purge できず、いずれもその後再発している。CML の場合、著者の実験でも、LTMC 単独で、しかも短期間では、Ph¹ 陽性クローンの purging は困難であり、本法のごとく IFN- α などの Ph¹ 陽性細胞に感受性を有する薬剤の併用が重要と考えられる。この場合、重大な問題は、図 2, 3 に示すごとく、LTMC と IFN- α の併用で、造血幹細胞を含めた有核細胞数の著しい減少である。一般に骨髄移植が成立するためには、10⁸ 個/kg レベルの細胞数が必要といわれ、これだけの細胞数をいかにして保持するかが、今後の課題である。最近、DNA 組み替え手法により、種々の cytokine が大量に生産され、既に、G-CSF, GM-CSF, erythropoietin などが臨床応用されている。加えてマウスを用いた in vitro の実験系では、IL3 と IL6 の併用で自己複製能を有する幹細胞を増殖しうることが指摘され³²⁾、ヒトにおいてもその可能性を中畑ら³³⁾ が報告している。従って近い将来、これらの cytokine を応用することにより、著者らの方法で Ph¹ 陽性クローンを purge したあと、自家骨髄移植に必要な幹細胞数を得ることができるものと考えられる。

以上、CML の根治療法として、LTMC と IFN- α により Ph¹ 陽性クローンを purging した自家骨髄移植の可能性と問題点について触れたが、一方、著者らが開発したこの培養法は、実際臨床的に IFN- α を投与された症例での、Ph¹ 陽性細胞抑制効果を反映する傾向があり、INF- α を用いて根治を目的とした治療を行う

場合の、症例の選択にも有用であることを付記したい。

ま と め

CML の根治療法、特に自家骨髄移植を確立することを目的として、LTMC と IFN- α の併用によって Ph¹ 陽性クローンの選択的除去を試み、以下の結論を得た。

I) CML 慢性期骨髄はいずれも良好な marrow stromal cell layer を形成し、LTMC は可能であった。しかし、浮遊細胞数は培養期間と共に著しく減少した。

II) LTMC 浮遊細胞中の Ph¹ 陰性クローンの出現を CFU-GM のレベルで確認した。この Ph¹ 陽性クローンの purging は、IFN- α の LTMC への添加で増強され、かつ濃度依存性であった。一例で、Ph¹ 陽性クローンの完全な消失が認められた。

III) 以上により、IFN- α 添加 LTMC は、CML 自家骨髄移植の際の Ph¹ 陽性クローンの purging の有力な手段となり得ると考えられるが、LTMC による CFU-GM を含めた細胞数の減少が問題と思われた。

IV) 臨床的に IFN- α の投与に早期に Ph¹ 陰細胞が台頭する症例は、in vitro (LTMC) においても Ph¹ 陰性細胞の出現率が高いことから、この培養法で、IFN- α の投与によって根治が期待できる症例を、あらかじめ選択することが可能と考えられる。

稿を終えるにあたり、懇切なるご指導、ご校閲を賜りました新潟大学第一内科柴田昭教授に深謝致します。また直接のご指導を頂きました第一内科森山美昭助教授、高橋益広先生、並びに自治医科大学血液内科佐藤裕子先生に厚く感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Fialkow, P.G., Gartner, S.M. and Yodisa, A.: Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. Proc Natl Acad Sci USA., 58: 1468~1471, 1967.
- 2) Groffen, J., Stephenson, J.R., Grosveld, G. et al.: Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. Cell., 36: 93~99, 1984.
- 3) Thomas, E.D., Clift, R.A., Fefer, A. et al.: Marrow transplantation for the treatment of chronic myelogenous leukemia. Ann Intern Med, 104: 155~163, 1986.
- 4) Talpaz, M., Kanterarjian H.M., McCredie, K. et al.: Haematologic remission and cytogenetic improvement induced by recombinant interferon alpha A in chronic myelogenous leukemia. N Eng J Med, 314: 1065~1069, 1986.
- 5) 小山 覚, 森山美昭, 柴田 昭, 他: 多施設共同研究による天然型インターフェロン (HLBI) の慢性骨髄性白血病に対する臨床試験. 癌と化学療法, 15: 2059~2066, 1988.
- 6) Colombel, L., Kalousek, D.K., Eaves, A.D. et al.: Long term marrow culture reveals chromosomally normal hematopoietic progenitor cells in patient with philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia. N Eng J Med, 308: 1493~1498, 1983.
- 7) Dexter, T.M., Allien, T.D. and Lajtha, L.F.: Conditions controlling the proliferation of haematopoietic stem cells in vitro. J Cell Physiol, 91: 335~344, 1976.
- 8) Gartner, S. and Kaplan, N.S.: Long term marrow culture of human bone marrow cells. Proc Natl Acad Sci USA, 77: 4756~4759, 1980.
- 9) Bolin, R.W., Robinson, W.A. and Hamman, R.F.: Busulfan versus hydroxyurea in long term therapy of chronic myelogenous leukemia. Cancer, 50: 1683~1686, 1982.
- 10) 成田美和子, 小山 覚, 柴田 昭, 他: Hydroxyurea の慢性骨髄性白血病に対する効果の臨床的解析. 医学のあゆみ, 45: 251~252, 1988.
- 11) Sharp, J.C., Journey, M.V., Wayne, A.W. et al.: Karyotypic conversion in Ph¹ positive chronic myelogenous leukemia with combination chemotherapy. Lancet: 1370~1372, 1979.
- 12) Cunningham, I., Gee, T., Dowlin, M. et al.: Results of treatment of Ph¹ positive chronic myelogenous leukemia with an intensive treatment regimen (L-5 protocol). Blood, 53: 375~395, 1979.
- 13) Goto, T., Nishiroki, M., Arlin, Z. et al.: Growth characteristics of leukemia and normal hematopoietic cells in Ph¹ chromosome positive chronic myelogenous leukemia and effects of intensive treatment. Blood, 59: 793~808, 1982.
- 14) Singer, J.W., Adamson, J.W., Fialkow, P.J. et al.: Chronic myelogenous leukemia: in vitro

- studies of hematopoietic regulation in a patient undergoing intensive chemotherapy. *J Clin Invest*, **67**: 1593~1598, 1981.
- 15) **Siger, J.W., Arlin, Z.A., Najfeld, V. et al.**: Restoration of nonclonal hematopoiesis in chronic myelogenous leukemia (CML) following a chemotherapy induced loss of the Ph¹ chromosome. *Blood*, **56**: 356~360, 1980.
- 16) **Thomas, E.D.**: The use and potential of bone marrow allograft and whole body irradiation in the treatment of leukemia. *Cancer*, **50**: 1449~1553, 1982.
- 17) **Czarnicki, C.M., Fennie, C.W., Powers, D.B. et al.**: Synergistic antiviral and antiproliferative activities of Escherichia coli derived alpha, beta, and gamma interferons. *J Virology*, **49**: 490~496, 1984.
- 18) **Talpaz, M., McCredie, K., Kantarjian, H. et al.**: Chronic myelogenous leukemia: hematological remission with alpha interferon. *Br J Haematol*, **64**: 87~95, 1986.
- 19) **Talpaz, M., Kantarjian, H., McCredie, K. et al.**: Clinical investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, **69**: 1280~1288, 1987.
- 20) **Morra, E., Alimena, G., Liberati, A.M. et al.**: Recombinant alpha2 interferon in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Proceeding of ASCO*, **6**: 145 (abstract), 1987.
- 21) 小倉浩美, 白藤尚毅, 熊川寿郎, 他: インターフェロン α により良好な経過を得ている CML の 2 症例. *臨床血液*, **28**: 1599~1604, 1987.
- 22) **Herve, P., Tamayo, E. and Peters, A.**: Autologous stem cell grafting in acute myeloid leukemia: Technical approach of marrow incubation in vitro with pharmacological agents. *Br J Haematol*, **53**: 683, 1983.
- 23) **Kaizer, H., Stuart, R.K., Brookmeyer, R. et al.**: Autologous marrow transplantation in acute leukemia: a phase study of in vitro treatment of marrow with 4-hydroperoxycyclophosphamide to purge tumor cells. *Blood*, **65**: 1504~1510, 1985.
- 24) **Yoshiaki, Moriyama., Miwako, Marita., Masuhiro, Takahashi., Akira, Shibata. et al.**: Application of hyperthermia to the treatment of human acute leukemia: purging human leukemic progenitor cells by heat. *Blood*, **67**: 802~804, 1986.
- 25) **Shinitiro, Okamoto., Olson, A. and Volger, W.**: Purging of acute myeloid leukemic cells by ether lipids and hyperthermia. *Blood*, **72**: 1777~1783, 1988.
- 26) **Mauch, P., Greenberger, J.S., Hellman, S. et al.**: Evidence for structured variation in self-renewal capacity with long term marrow cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*, **77**: 2927~2930, 1980.
- 27) **Pelus, L.M., Ottmann, O.G. and Nocka, K.H.**: Synergistic incubation of human marrow granulocyte-macrophage progenitor cells by prostaglandin E and recombinant interferon α , β and γ an effect mediated by tumor necrosis factor. *J Immunol*, **140**: 479~484, 1988.
- 28) **Frassoni, F., Reppet, M., Marmont, A.M. et al.**: Competitive survival/proliferation of normal and Ph¹ positive haemopoietic cells. *Br J Haematol*, **63**: 135~141, 1986.
- 29) **Chang, D., Morgenstern, G.R., Dexter, T.M. et al.**: The use of bone marrow cells grown in long-term for autologous bone marrow transplantation in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplantation*, **4**: 5~9, 1989.
- 30) **Colombel, L., Eaves, C.J., Eaves, A.C. et al.**: Long-term marrow culture of cells from patients with acute myelogenous leukemia (AML): selection in favour of normal phenotypes in some but not all cases. *J Clin Investigation*, **75**: 961~969, 1985.
- 31) **Barnett, M.J., Eaves, C.J., Eaves, A.C. et al.**: Successful autografting in chronic myeloid leukemia after maintenance of marrow in culture. *Bone Marrow transplantation*, **4**: 345~351, 1989.
- 32) **Okano, A., Suzuki, C., Asano, S. et al.**: In vitro expansion of the murine pluripotent hemopoietic stem cell population in response to IL3 and IL6. Application to BMT. *Transplantation*, **48**: 495~498, 1989.
- 33) 中畑龍俊: 造血幹細胞の自己複製と造血因子. 第12回日本骨髄移植研究会, 東京: 16, 1989.
(平成2年1月24日受付)