



# 論文内容要旨

## 1. 研究目的

近年末梢血幹細胞移植（PBSCT）が盛んに行われるようになり、末梢血幹細胞の採取時期については各施設で様々な方法が試みられている。

今回、著者らは末梢血幹細胞採取の効率向上を目的として、全血法による三重染色フローサイトメトリー法を応用して末梢血幹細胞移植を行う際に必須である血液幹細胞群（PBSC）を適切に同定し、CD34・CD33 両陽性細胞の算出法の精度向上と CFU-GM コロニー形成能によるその確認、および化学療法後の骨髄抑制中に末梢血中出现する c-kit 陽性細胞の意義、特にその後の CD34・CD33 両陽性細胞出現態度の予知の可能性について検討を行った。

## 2. 研究方法

対象：腫瘍細胞が CD34 陰性であることを確認した急性白血病 10 例、悪性リンパ腫 3 例、顆粒球肉腫、網膜芽細胞腫、神経芽細胞腫、癌性髄膜炎各 1 例である。

方法：化学療法後の末梢血白血球回復期（白血球  $500/\mu\text{l}$  よりほぼ  $10,000/\mu\text{l}$  まで）に 2 日ごとにヘパリン加末梢血を採血し、抗体反応後に溶血して測定する全血法を用いた。モノクローナル抗体は、CD34、CD33、CD45、HLA-DR、CD2、CD3、CD4、CD20（Becton-Dickinson 社）、CD14（コールタ社）およびマウス抗ヒト c-kit 抗体（ニチレイ）を使用し、Becton-Dickinson 社製の FACScan にて解析した。FACScan での操作は、まず CD34、CD33 陽性細胞の判定は従来のごとくリンパ球・単球群にゲートする方法で解析した。c-kit 陽性細胞の判定方法は、scattergram 上で CD34 陽性細胞の位置を確認後、その部分のみに gate をかけて細胞形態による制限をおこなった。次に、成熟単核球を除くためシングルヒストグラムでその陰性群のみを取り込む操作（gate out）、すなわち抗原発現による取り込み制限を行い判定した。

## 3. 研究結果

この方法により、CD34 陽性細胞の同定に際して細胞成分、非細胞成分の鑑別が従来の 2 重染色に比し容易となり、CD34・CD33 両陽性細胞群はリンパ球、単球群の中間に位置していることが明瞭に確認できた。また測定誤差を少なくするため、複数検体での検討が必要と思われた。さらにこれらの結果が従来のコロニーアッセイ法と有意な正の相関を有することを確認した。この測定法により化学療法後の末梢血で c-kit 陽性細胞を把握する方法を工夫した結果、骨髄抑制期間中に出現する c-kit 陽性細胞とその後出現する CD34・CD33 両陽性細胞との間で以下の点

が明らかになった。①CD34・CD33 両陽性細胞は治療後早期（骨髄抑制期間中）に一過性に出現（8 症例，74%）する傾向がみられた。その後 CD34・CD33 両陽性細胞は減少ないし消失して，末梢血回復期に再び増加する。このような 2 峰性を示す症例が（6 症例，64%）みられた。②c-kit 陽性細胞のうち CD34 陰性細胞が占める割合により 3 群に分類することが可能であった。A 群は c-kit 陽性・CD34 陰性細胞が高率（50%）に認められた 3 症例，C 群は c-kit 陽性・CD34 陰性細胞の出現頻度が 5 分の 1 以下だった 3 症例で，B 群は A 群と C 群の中間に位置した 4 症例であった。③この分類の結果，A 群と B 群のように c-kit 陽性細胞が，一過性でも大きな割合を占める時期があると，その後に CD34・CD33 両陽性細胞が末梢血中に多く出現してくる傾向があり，その後の予測が可能と考えられた。

#### 4. 考 察

今回，全血法を利用し scattergram でリンパ球・単球群に live gate をかけて取り込む 3 重染色フローサイトメトリー法での CD34 陽性細胞数の算出法が精度において優れ，モニタリングとしての簡便さを考慮すると，単核球分離法に比して，より実用的で有用と考えられた。これまで c-kit 陽性細胞の動態について，恒常状態の骨髄，臍帯血，またマウス胎生期の肝細胞や卵黄嚢での検討はあるものの今回のような化学療法後の造血再構築過程で，末梢血中の動態を検討した報告はない。化学療法後の c-kit 単独陽性細胞の出現がかならずしも CD34 陽性細胞の出現と同じ態度をとらず，しかも化学療法の強さの程度でその出現様式が異なる可能性が初めて示唆された。末梢血幹細胞採取の決定については c-kit 陽性細胞の動態をモニタリングの一つとして採り得ると考えられた。

## 審査結果の要旨

末梢血幹細胞移植 (peripheral blood stem cell transplantation : PBSCT) は同種骨髄移植に比して、ドナーの有無による制限や移植片対宿主反応がなく利点を有している。また、PBSCTは手技、設備の簡便性のため多くの医療機関で施行可能であり、造血器をはじめ多くの悪性腫瘍の有力な治療手段となりつつある。PBSCTを施行する上で最も重要な作業は末梢血幹細胞 (PBSC) の採取であり、その採取では時期の決定と量的評価がキーポイントになる。採取時期の決定は、初期には白血球、血小板の数的推移や CFU-GM コロニー培養法による造血幹細胞の直接評価で行っていたが、前者は採取時期の正確な決定は困難であり、後者も培養結果が採取時期より遅れるのが欠点である。次に、単染色フローサイトメトリーによる CD34 陽性細胞の出現率を指標とする方法が行われ、これも誤差が大きく算出される値は十分に信頼できない。現在では、CD34・CD33 の二重染色による両陽性細胞で PBSC 出現のモニタリングをするのが一般的であるが、精度的にまだ十分でない。さらに、症例毎に採取可能な PBSC の量的な予知は全く不可能であった。

本研究では、1) PBSC のモニタリングに三重染色フローサイトメトリー法を導入することにより非細胞成分が除去可能となり、その結果と造血幹細胞の直接算定法である CFU-GM コロニー培養結果で有意な相関を得たことにより精度の向上を可能とした。2) 従来、c-kit 陽性細胞は弱陽性にしか発現せず、しかも著しく小数なため血液疾患で末梢血の c-kit 陽性細胞の動態は検討できなかった。しかし、三重染色フローサイトメトリー法を改良し、造血幹細胞抗原である c-kit 陽性細胞を把握可能にし、PBSC のモニタリングに応用した。3) 化学療法後の骨髄抑制期の前後の c-kit 陽性細胞出現程度と骨髄回復期の CD34・CD33 両陽性細胞の出現程度とを比較検討し、その結果、両者が相関することを見出し、末梢血中 PBSC の量的推移をある程度予知可能であることを初めて明らかにした。

本研究は末梢血幹細胞の採取の可否を c-kit 陽性細胞の出現態度により早い時期で決定可能としたもので、臨床的に大変価値ある研究で、十分学位論文に値するものと認める。