

博士(医学) 小林良二

学位論文題名

小児造血器疾患における末梢血 CD34陽性細胞の動態

学位論文内容の要旨

CD34 は造血幹細胞に発現する抗原で、それに対する抗体は広く用いられている。この CD34 陽性細胞を末梢血中より回収し自家移植をおこなう末梢血幹細胞移植が白血病や 固形腫瘍などで最近おこなわれ注目されている。しかしながら再生不良性貧血において末梢血中 CD34 陽性細胞の推移を検討した報告はみられていない。今回、小児再生不良性貧血症例において免疫抑制療法・サイトカイン療法の終了後および急性白血病・悪性リンパ腫症例の化学療法回復期に末梢血 CD34 陽性細胞の推移を検討した。

**【方法】** CD34 陽性細胞の測定は末梢血もしくは骨髄血を Ficoll-Paque にて単核球に分離後、CD34, CD33 あるいは HLADR で二重染色を施行し FACScan にておこなった。検討する項目としては末梢血においては総単核球数における CD34 陽性細胞の割合(%) および CD34 陽性細胞数( $\mu l$ )とした。一方骨髄血においては総単核球数にしめる CD34 陽性細胞の割合(%)とした。stem cell assay はメチルセルロース法にておこなった。

**【対象】**

1. 再生不良性貧血症例

平成 3 年 1 月より平成 5 年 9 月までに当科に入院した小児再生不良性貧血 5 例の末梢血中および骨髄中の CD34 陽性細胞を免疫抑制療法施行時・サイトカイン療法施行時に経時に検索した。症例は 3 ~ 11 歳で男 2 例、女 3 例、いずれも特発性再生不良性貧血で、重症度は重症 1 例、中等症 4 例であった。免疫抑制療法は原則として抗リンパ球グロブリン, cyclosporinA, methyl prednisolone パルス療法をおこない、サイトカイン療法は G-CSF および erythropoietin とした。原則として、まず免疫抑制療法をおこない効果が不十分な症例、あるいは再燃をみた症例にサイトカイン療法をおこなった。治療効果は、免疫抑制療法では 5 例中 3 例が good response、2 例が partial response であった。一方、サイトカイン療法では 3 例全例において好中球数の速やかな増加を認めた。なお検定には t 検定を用いた。

2. 急性白血病・悪性リンパ腫症例

対象は平成 3 年 4 月より平成 5 年 9 月までに北海道大学医学部付属病院小児科に入院した急性リンパ性白血病 6 例(12 回)・悪性リンパ腫 2 例(3 回)で年齢は 0 ~ 15 歳、男 4 例(6 回)、女 4 例(9 回)であった。寛解期化学療法の骨髄抑制回復期に granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) を平均 5 日間投与し末梢血中の CD34 陽性細胞の検討をおこなった。

### 3. 正常コントロール群

コントロール群として非血液疾患小児 12 例(先天性甲状腺機能低下症 5 例、副甲状腺機能低下症 2 例、腎性糖尿病 2 例、単純性肥満、Turner 症候群、Addison 病各 1 例)の末梢血 CD34 陽性細胞の検索をおこなった。

## 【結果】

### 1. 再生不良性貧血症例

免疫抑制療法による末梢血 CD34 陽性細胞の変動は 4 例において観察することができた。免疫抑制療法によって good response であった 3 例では、末梢血中 CD34 陽性細胞数は増加の傾向をみとめ、コントロール群より明らかに高値を呈した。しかしながら、血小板数の増加を認めず partial response であった 1 例では増加は認められなかった。CD34 陽性細胞の中の分画では CD33 陽性細胞、HLADR 陽性細胞とも一定の傾向はみられなかった。3 例においてサイトカイン療法時の末梢血 CD34 陽性細胞の変動を観察した。投与前より観察し得た 2 例では G-CSF 投与直後より明らかに増加傾向がみられ、また、G-CSF 投与後 5 週間経過して観察をおこなった 1 症例においてもコントロール群 ( $0.17 \pm 0.08\%$ ,  $6.90 \pm 4.43/\mu\text{l}$ ) に比較して明らかに増加を認めた。一方、CD34 陽性細胞の分画では CD33 陽性細胞が G-CSF 投与期間が長くなるに従い増加する傾向がみられた。HLADR 陽性細胞には一定の傾向はなかった。すべての症例において免疫抑制療法中およびサイトカイン療法中に複数回末梢血の stem cell assay を試みたが、いずれにおいても多数のリンパ球コロニーの形成のため観察不能であった。しかしながら、1 例において磁気ビーズにて CD34 陽性細胞を単離・培養したところ単核細胞  $10^5$ あたり 120 の CFU-GM の形成を認めた。5 症例において、のべ 8 回骨髄血と末梢血を同時に CD34 陽性細胞の検索をおこない、末梢血 CD34 陽性細胞数 ( $/\mu\text{l}$ ) と骨髄中 CD34 陽性細胞の割合は正の相関を認めた ( $r=0.78251$ ,  $p<0.025$ )。

### 2. 急性白血病・悪性リンパ腫症例

のべ 15 回の測定で末梢血中の CD34 陽性細胞は単核球に対する割合として  $7.90 \pm 9.42\%$ 、CD34 陽性細胞数として  $171.75 \pm 238.66/\mu\text{l}$  といずれもコントロール群と比較して有意に高値であった ( $p<0.025$ )。また CD34 陽性細胞の割合は単核細胞  $10^5$ あたりの CFU-GM と正の相関を認めた ( $r=0.68804$ ,  $p<0.01$ )。

【考察】各種の悪性腫瘍において化学療法後の造血幹細胞が末梢血中に増加した時期に回収し、これを自家末梢血幹細胞移植として輸注する治療が最近おこなわれつつある。今回の検討においても急性リンパ性白血病・悪性リンパ腫において化学療法後の骨髄回復期に G-CSF を投与することにより正常の数十倍に CD34 陽性細胞が増加することが確認された。

一方、再生不良性貧血は患者発生数が小児においては全国で年間約 100 例と少なく、従来このような研究報告が全くみられないため、本疾患においても化学療法の回復期と同様に造血機能が回復する際に CD34 陽性細胞の末梢血中への増加がみされることを期待し検索をおこなった。免疫抑制療法では 4 症例中 good response であった 3 例においてその細胞数は増加を認め、再生不良性貧血症例の中に免疫抑制療法後に末梢血 CD34 陽性細胞が増加する症例があることが初めて明らかとなった。一方、サイトカイン療法による変動はいずれも G-CSF 開始後に一過性に CD34 陽性細胞の末梢血中への増加がみられ、再生不

良性貧血症例においても G-CSF 投与により一過性の CD34 陽性細胞の増加、特に CD34<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>細胞の増加がみられることが明らかになった。また、末梢血 CD34 陽性細胞数は骨髄中の CD34 陽性細胞の割合と有意な正の相関を示した。以上のことより、再生不良性貧血において骨髄機能の回復期や G-CSF の投与により CD34 陽性細胞すなわち造血幹細胞の末梢血中への流出の増加がみられることが今回知られた。

#### 【結論】

1. 今まで報告のない小児期再生不良性貧血症例における免疫抑制療法・サイトカイン療法経過中の末梢血 CD34 陽性細胞の推移を検討した。
2. 再生不良性貧血症例において免疫抑制療法やサイトカイン療法後の骨髄回復期に末梢血中 CD34 陽性細胞の増加がみられることがあることが明らかとなつた。
3. 急性白血病・悪性リンパ腫症例の化学療法回復期には正常人の約 30 倍の CD34 陽性細胞が末梢血中に出現することが知られた。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 松本脩三  
副査 教授 小池隆夫  
副査 教授 上出利光

## 学位論文題名

### 小児造血器疾患における末梢血 CD34陽性細胞の動態

CD34は造血幹細胞に発現する抗原で、それに対する抗体は白血病や 固形腫瘍などの末梢血幹細胞移植のための幹細胞採取に際して既に用いられている。今回、小児の再生不良性貧血において末梢血中CD34陽性細胞の推移を検討した報告がないことに注目し、申請者は小児再生不良性貧血症例の免疫抑制療法・サイトカイン療法の終了後および急性白血病・悪性リンパ腫症例の化学療法回復期に末梢血CD34陽性細胞がどのように推移するかを検討した。CD34陽性細胞の測定は末梢血もしくは骨髄血を単核球に分離した後、CD34、CD33あるいはHLADRで二重染色を施行し、FACScanで測定し、また、stem cell assayはメチルセルロース法で行った。小児再生不良性貧血5症例では抗リンパ球グロブリン、cyclosporin A、methyl-prednisoloneパルス療法の免疫抑制療法によりgood responseであった症例群では、末梢血中CD34陽性細胞数は増加の傾向を認め、コントロール群より明らかに高値を呈した。しかしながら、血小板数の増加を認めずpartial responseであった症例では増加を認めていない。また、G-CSFおよびerythropoietinによるサイトカイン療法後の症例群ではG-CSF投与直後より幹細胞には明らかに増加傾向がみられ、また、G-CSF投与後5週間経過して観察を行った症例においてもコントロール群に比較して明らかに増加を認めた。一方、寛解期化学療法の骨髄抑制回復期にG-CSFを平均5日間投与し測定した急性白血病・悪性リンパ腫症例の末梢血CD34陽性細胞数はコントロール群の約30倍に及ぶことが知られた。

以上のことから小児再生不良性貧血において免疫抑制療法後、あるいはG-CSFの投与後に末梢血CD34陽性細胞が増加する症例のあることが明らかとなり、また急性白血病・悪性リンパ腫では治療後の骨髄機能の回復期やG-CSFの投与によりCD34陽性細胞（造血幹細胞）の末梢血中への流出が増加することが明らかにされた。このことは、今後末梢血中に出現する幹細胞の機能の解明如何では再生不良性貧血においてもCD34陽性細胞の単離による自家末梢血幹細胞移植に道が開かれる可能性を示しており、学位論文として価値あるものと判断された。

以上の諸点につき、副査の小池、上出、両教授、並びに宮崎教授らから数問の質疑が交わされたがすべてに概ね順当な答えが得られ、学位の価値を持つ研究と判定された。