

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19555

研究課題名(和文) 同種移植後のリンパ球減少の深さと持続期間を同時に評価する新たな指標の開発

研究課題名(英文) Investigation of a novel index to evaluate both the intensity and duration of lymphopenia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

研究代表者

木村 俊一 (Kimura, Shun-ichi)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70623031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：2年間で登録された29例のうち移植後早期のデータが固まった25症例で解析した。前処置開始から移植後1か月までの総リンパ球数(TLC)の減少の程度を面積で評価したL-index(30)はサイトメガロウイルスアンチゲネミア(CMV-AG)が3個以上に増加した陽性群において、3個未満にとどまった陰性群と比較して有意に高値を示した。特に移植後14日目、21日目、28日目のTLC低値がCMV-AG陽性化を予測する因子であることが示唆された。リンパ球サブセットごとの検証では、14日目、21日目、28日目のCD4陽性のTリンパ球数低値、CD56陽性のNKリンパ球数低値がCMV-AG陽性化と関連を認めた。

研究成果の概要(英文)：Among 29 registered patients during 2-year period, 25 patients with fixed data of early phase after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) were analyzed. L-index(30), which evaluated the intensity of lymphopenia using area under total lymphocyte count (TLC) curve from the start of conditioning regimen to 1 month after HSCT in positive cytomegalovirus antigenemia (CMV-AG) group with ≥ 3 CMV-AG was significantly higher than that in CMV-AG negative group with < 3 CMV-AG. Particularly, low TLCs at day14, day21 and day28 after HSCT were suggested to be predictive factors for positive CMV-AG. In lymphocyte subset analysis, low CD4 positive T lymphocyte count and low CD56 positive NK cell count at day14, day21 and day28 after HSCT were associated with positive CMV antigenemia.

研究分野：造血幹細胞移植

キーワード：リンパ球減少 同種移植 T細胞 NK細胞 サイトメガロウイルス 移植片対宿主病 生存率

1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植後のリンパ球再構築は日和見感染症の制御、抗腫瘍効果などにおいて重要な役割を果たす。さらに、リンパ球再構築の遅れがT細胞の寛容を減じ、移植片対宿主病(graft-versus-host disease; GVHD)の発症につながるという報告もある。日常診療におけるリンパ球再構築の評価は、総リンパ球数のほか、フローサイトメトリーを用いたサブセット解析によるT細胞数、CD4陽性T細胞数、CD8陽性T細胞数、CD4/8比、NK細胞数、B細胞数などが一般的に用いられているが、これらは1ポイントの血液サンプルから得られた結果に基づいており、リンパ球減少の持続期間は考慮されていない。申請者らは、総リンパ球数とリンパ球減少の持続期間の両者を面積を用いて評価するL-indexを考案し、自治医科大学附属さいたま医療センター血液科で同種造血幹細胞移植を受けた患者を対象とした後方視的コホート研究において、L-indexがサイトメガロウイルス再活性化と関連することを報告した(Kimura SI et al. *Transpl Infect Dis* 2012)。

この研究において、L-index、総リンパ球数、CD4陽性T細胞数、CD8陽性T細胞数などのリンパ球減少の指標とCMV再活性化との関連を検証したところ、移植後30日での総リンパ球数はCMV再活性化群、非再活性化群で有意差を認めなかったが、移植前処置開始から移植後30日までのL-indexは再活性化群で有意に高値であった。多変量解析において、L-indexは年齢とともにCMV再活性化に関連する独立した有意な因子として同定された。この研究の結果、同種移植後のリンパ球減少状態において、リンパ球の絶対数だけでなく、その持続期間を同時に評価することの重要性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、総リンパ球数に加えて、T細胞、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、NK細胞、B細胞などのサブセットごとのリンパ球減少の深さと持続期間を面積を用いる手法で評価し、同種移植後の日和見感染症、移植片対宿主病(GVHD)、抗腫瘍効果との関連を詳細に検討することで、サブセットごとのリンパ球減少の深さと持続期間の意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 同種移植後のリンパ球サブセット解析
同種移植前と移植後に定期的に血算・白血球分画検査とリンパ球サブセット解析を行う。同種移植前、移植後2週、3週、4週、6週、8週、10週、12週で測定を実施する。リンパ球サブセット解析はフローサイトメトリーを用いて行う。T細胞、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、NK細胞、B細胞数の絶対数を移植後の日数に合わせてプロットし、絶対数と

期間を面積で表す指標を算出する。この時、L-indexで用いたように閾値を定めて欠損の面積を用いたり、プロットしたグラフの下の面積(AUC)を指標とするなど、欠損部分が重要なAUCが重要ななどについても探索的に詳細に検証する。

(2) ウイルス感染症の評価

同種移植後のCMV感染症の検出には、CMVアンチゲネミアC10/C11法を用いる。好中球生着後、週1回のペースで測定する。HSV、VZV、HHV-6、EBV、アデノウイルス、BKV、RSV、パラインフルエンザウイルスによる感染症が疑われる場合、PCR法を用いて検出を行う。検体は血液、髄液、尿、ぬぐい液、気管支肺胞洗浄液など、感染症が疑われる部位から採取する。HSVは口唇・口腔のぬぐい液、髄液、血液、VZVは皮疹部、血液、HHV-6は髄液、血液、EBウイルスは血液、アデノウイルス、BKウイルスは尿の検体、RSV、パラインフルエンザウイルスは気管支肺胞洗浄液などを用いる。

(3) その他の感染症の評価

その他の一般細菌感染症、真菌感染症、ニューモシチス肺炎などの発症についても移植後の経過をフォローする。真菌感染症、ニューモシチス肺炎は細胞性免疫の低下した状態で、莢膜を有する細菌は液性免疫の低下した状態で起きやすい。真菌は培養、細胞診などで同定するが、難しい場合には18s rRNAを用いた遺伝子解析を用いる可能性がある。ニューモシチス肺炎の診断は細胞診の他、気管支肺胞洗浄液で異型肺炎やPneumocystis jiroveciiをPCR法を用いて検出する。異型肺炎が疑われる場合にもPCRを用いる。細菌感染症は培養検査を用いて診断するが、同定が難しい場合には16s rRNAを用いた遺伝子解析、質量分析などを用いる。

(4) その他、臨床経過の評価

GVHDの発症、長期予後(生存率、治療関連死亡)についても日常臨床で経過をフォローする。

(5) リンパ球減少の指標と日和見感染症、GVHD、予後との関連の解析、新たなリンパ球減少の指標の開発

リンパ球サブセットごとの指標と期間とウイルス感染症、その他の日和見感染症、GVHDの発症、治療関連死亡や生存率との関連を解析する。その際、患者背景、疾患背景、移植方法、移植後経過など、その他の臨床的な因子も合わせて解析する。解析結果に基づき、移植後の日和見感染症の発症、GVHDの発症の有無や重症度、さらには予後を予測する新たな指標を開発する。

4. 研究成果

2年間で29例が登録された。このうち、移

植後早期のデータが固まった 25 症例を解析し、評価を行った。

(1) 解析を行った 25 症例の背景

年齢の中央値は 52 歳 (20 ~ 68 歳) 男性 17 例、女性 8 例であった。疾患の内訳では、急性白血病が 14 例 (急性骨髄性白血病 8 例、急性リンパ性白血病 6 例) と最も多く、骨髄異形成症候群 6 例、非ホジキンリンパ腫 2 例、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、骨髄増殖性腫瘍がそれぞれ 1 例ずつであった。アレムツズマブあるいは抗胸腺細胞グロブリンは 5 例で使用された。移植前処置は、骨髄破壊的前処置が 16 例、骨髄非破壊的前処置が 9 例、全身放射線照射は 16 例で使用された。移植種類としては、骨髄移植が 12 例、末梢血幹細胞移植が 13 例であった。ドナーは、血縁者間が 10 例、非血縁者間が 15 例、HLA 適合が 13 例、不適合が 12 例であった。移植の標準リスクは 17 例、高リスクが 8 例であった。

(2) 移植後経過

サイトメガロウイルスアンチゲネミア (CMV-AG) 3 個以上になった陽性群は 18 例、3 個未満にとどまった陰性群は 7 例であった。CMV-AG 陽性群のうち 5 例は CMV-AG 50 以上への増加を経過中に認めた。ウイルス感染症は 3 例、真菌感染症を 5 例で認めた。急性移植片対宿主病 (GVHD) は 18 例で発症を認め、そのうち 4 例は grade - の重症急性 GVHD であった。2 例が経過中に死亡し、いずれも重症急性 GVHD が関与した。

(3) 移植後早期のリンパ球数の推移

移植前	中央値 [範囲]
総リンパ球数	590 [72, 2406]
CD3 陽性細胞数	474 [59, 1822]
CD4 陽性細胞数	228.94 [53, 1059]
CD8 陽性細胞数	232 [13, 799]
CD19 陽性細胞数	7 [0, 247]
CD56 陽性細胞数	95 [4, 367]
Day14	
総リンパ球数	16 [0, 528]
CD3 陽性細胞数	8 [0, 521]
CD4 陽性細胞数	6 [0, 503]
CD8 陽性細胞数	2 [0, 61]
CD19 陽性細胞数	0 [0, 2]
CD56 陽性細胞数	1 [0, 31]

Day21

総リンパ球数	91 [0, 464]
CD3 陽性細胞数	56 [0, 449]
CD4 陽性細胞数	41 [0, 389]
CD8 陽性細胞数	16 [0, 175]
CD19 陽性細胞数	1 [0, 6]
CD56 陽性細胞数	10 [0, 170]

Day28

総リンパ球数	303 [33, 1125]
CD3 陽性細胞数	220 [1, 1035]
CD4 陽性細胞数	52 [7, 246]
CD8 陽性細胞数	160 [2, 828]
CD19 陽性細胞数	1 [0, 25]
CD56 陽性細胞数	71 [6, 345]

(4) リンパ球数と CMV-AG 陽性化との関連

移植前処置開始から移植後 1 か月までの早期の総リンパ球数 (TLC) の減少の程度を面積で評価した L-index(30)はサイトメガロウイルスアンチゲネミア (CMV-AG) 3 個以上に増加した陽性群において、3 個未満にとどまった陰性群と比較して、有意に高値を示し (中央値 20628 vs. 17186, P=0.046) われわれの報告した既報 (Kimura SI et al. Transpl Infect Dis 14: 364-373, 2012) の再現性を証明する結果となった。さらに詳細を解析したところ、特に移植後 day14、day21、day28 の TLC が CMV-AG 陽性化を予測する重要な因子であることが示唆された (day14 TLC 8 vs. 151, P=0.023 ; day21 TLC 72 vs. 318, P=0.072 ; day28 TLC 255 vs. 444, P= 0.096)。リンパ球サブセットごとの検証では、day14、21、28 の CD4 陽性の T リンパ球数、CD56 陽性の NK リンパ球数が CMV-AG 陽性化と強い関連を認めた (CD4+細胞 day14 4 vs. 102, P=0.021 ; day21 30 vs. 154, P=0.044 ; day28 35 vs. 135, P=0.11 ; CD56+細胞 day14 0.59 vs. 5.19, P=0.068 ; day21 7 vs. 49, P=0.018 ; day28 45 vs. 125, P=0.046)。

(5) 患者背景と CMV-AG 陽性化との関連

背景因子と CMV-AG 陽性化との関連を検証したところ、陽性化群で患者年齢が高かった (54 歳 vs. 32 歳, P=0.012)。その他、疾患や移植前処置、HLA ミスマッチなどでは有意差はみられなかった。

(6) 今後の方向性

リンパ球減少の各指標と、移植片対宿主病 (GVHD) 生存率に対する影響などは、さらに観察を継続して検証を進めていく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

木村俊一 (KIMURA, Shun-ichi)

自治医科大学総合医学第1講座・講師

研究者番号：70623031

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()