

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

池上 由美子

論文題目

口腔粘膜の視診と口腔粘膜上皮細胞の
XY-FISH を用いた
造血幹細胞移植後の新たな生着モニタリング法

I. 緒言

造血幹細胞移植 (HSCT) は、白血病などの血液悪性腫瘍の最も有望な治療法で、正常な造血機能を回復するために実施されるが、骨髄破壊的前処置と免疫抑制療法は、生着後も課題を有しており HSCT の成功ひいては患者の生命予後にとって重要である。

口腔ケアの重要性は医療分野で注目されており支持療法として認識されてきた。特に HSCT 治療の場合、患者が極度の免疫不全状態になるため、口腔からの感染症のリスクを軽減するには、口腔の状態を評価し必要な治療を行うことが重要である。

口腔ケアチームは、患者が HSCT の前処置に入る少なくとも 2 週間前から、患者に口腔ケアを提供しておりその経験で、HSCT 治療後多くの場合口腔粘膜の状態の改善が従来行われてきたマーカーによる生着の検出より先行することに気づいた。また、口腔粘膜の改善と並行して口腔粘膜上皮 (OME) 細胞診で口腔粘膜への好中球の蓄積が認められ、その後骨髄穿刺検査 (BMA) のキメラ現象分析によって生着が確認された。

さらに、口腔の粘膜の状態の改善が、好中球数 (ANC) によって確認された生着よりも数日先行しており、この知見は HSCT の治療経過判定における新たなマーカーになりうると着想した。その後、性別の一致しない幹細

胞移植の場合に用いる X 及び Y 染色体特異プローブ (XY-FISH) は、OME 細胞診にも適用できることが明らかとなったので本研究では、口腔粘膜の状態の改善と OME のキメラ現象との関係进行分析するために、BMA の XY-FISH 分析と並行して OME 細胞の XY-FISH 分析を実行する事とした。

II. 材料および方法

1. 対象

がん・感染症センター都立駒込病院で、性別不一致 HSCT を受けた患者のうち同意の得られた 26 名を対象とした。年齢、性別、原発性疾患の名前、移植前処置のカテゴリーおよび免疫抑制レジメン、幹細胞源に関する情報を抽出した。

2. 生着の決定

HSCT 後の生着の決定には ANC が、 $> 500 / \mu\text{L}$ を示した日が連続した 3 日間の最初の日を生着日と定義としている。本研究においてもこの方法を採用し実施し生着を定期的に確認した。

3. 口腔の視覚検査

HSCT 患者の口腔の視覚検査は、口腔内写真は移植前処置の前後、免疫抑制レジメンの後、および口腔粘膜の状態の改善が検出されたときに左右の頬粘膜と舌、口蓋、口腔底の写真を撮影して行った。

4. 擦過細胞診の標本

擦過細胞診の標本は移植前処置の前後、免疫抑制レジメンの後、口腔粘膜の状態の改善が検出された時、並びに BMA 施行日に左右の頬粘膜と口蓋、口腔底をそれぞれ細胞診ブラシを用いて擦過した後、パパニコロウ染色を行った。

5. 骨髄穿刺検査

骨髄穿刺検査の採取時期は、生着確認のために 28 日目と 56 日目（早期生着が期待される場合は 14 日目）。再発と、遅発性生着不全の確認のために 3、6、12、18、24、36、48、および、60 か月後に行うが、主治医が必要と判断した場合は適宜行っている。

6. 口腔粘膜細胞診

口腔粘膜細胞診は、標準的な検査方法に従って実施し染色された標本は、

炎症に関連する細胞の変化、微生物の有無および好中球の有無について光学顕微鏡下で観察した。

7. キメラ現象分析

性別不一致の HSCT を行なった場合は、未分画の BMA と OME 細胞の両方を、SRL Inc. の XY-FISH で分析した。

III. 結果

移植前処置前の口腔粘膜は、標準的な口腔の状態であり通常は正常で OME 細胞は通常異型細胞を示さず、それらの周囲に微生物はほとんど観察されなかった。移植前処置後の HSCT 患者は、重度の免疫不全状態を示し大量の炎症性サイトカインと口腔内細菌による 2 次感染によって口腔粘膜のびらんが引き起こされた。この段階では、OME 細胞の異型細胞と OME 細胞の周囲の細菌や真菌などの多くの微生物の存在を示した。OME 細胞の周囲は、日和見病原体である可能性のある微生物が豊富であるにもかかわらず、好中球やその他の免疫細胞は観察されなかった。

口腔粘膜の改善は、HSCT 後 10 日目から通常は 14 日目頃に観察されその

時、OME細胞の周りの好中球の蓄積が明白であった。口腔粘膜改善時に、検出されたすべての症例で好中球の蓄積が観察された。平均して生着は、ANC > 500 / μ L の HSCT では 17.7 日後、視覚検査、口腔内の擦過細胞診の HSCT では 13.8 日後に決定された。

BMA と OME 細胞を XY-FISH で分析した結果、OME のドナー型細胞の割合は HSCT 後 4 週間以内に BMA の割合よりも低いことが多いが、OME のキメラ現象の割合の変化は HSCT 後 8 週間以降の BMA の割合の変化を反映しているように見えた。

分析結果から、XY-FISH は BMA より遅れるものの OME 擦過細胞診でも実施可能である。BMA では 26 例中 24 例は 28 日目に生着を示す 97% 以上のドナー型細胞を示し、56 日目で 97% 以上のドナー細胞を示さなかった症例は 1 例のみであった。一方 OME では、28 日目にはパーセンテージは 0.0 ~ 59.0% の範囲であり、56 日目には 10.0 ~ 99.0% の範囲であった。ドナー型細胞の割合は低かったものの、OME の変化は BMA の変化を反映しているようであった。

また、OME の状態を観察することで再発に関する情報が得られた。症例 16、症例 21 では、口腔粘膜の変化に気づき OME の擦過細胞診を XY-FISH で分析した結果ドナー型細胞の比率が下がっており主治医に連絡し、BMA のキメラ解析等の臨床検査を実施し再発を早期に確認できた。

IV. 考察

HSCT 治療中の患者の口腔ケアを行った経験により、口腔粘膜を綿密に観察し、HSCT 後の擦過細胞診を分析した。

OME 擦過細胞診は、一般的で簡単に実行できる手技で骨髄穿刺などの他の検査に比べて侵襲性が低く安全である。口腔粘膜が改善された患者は、例外なく数日後に従来のマーカーである ANC によって生着が検出された。本研究により 口腔粘膜の改善なしに患者から得られた標本は、全て OME 細胞周辺の好中球の蓄積又は十分な ANC レベルを示さず 口腔粘膜の改善は、生着の前兆候と確認された。更に、BMA と OME 細胞の両方の XY-FISH 分析でも生着が後で確認された。パパニコロウ染色された、OME 塗抹標本の観察によって裏付けられた口腔粘膜の視覚検査で、生着を検出するのに

必要な期間は、従来のマーカーである $ANC > 500 / \mu L$ よりも 3.9 日短かった。

(解析は t 検定で実施し有意差あり $p < 0.05$)。この結果は、口腔粘膜の状態の改善が移植された造血幹細胞の生着の確認に、先行するという自身の臨床経験と一致していた。

好中球は、日和見感染であるかどうかに関係なく細菌又は真菌感染の部位に集中する。免疫不全の HSCT 患者の口腔粘膜は、必然的に重度の口腔粘膜炎を発症する。可能であれば、好中球が動員され感染が防御できることが望ましい。Cheretakis らの報告によると、HSCT 患者で好中球が正常に発生すると損傷組織及び感染組織での好中球の蓄積が一般的に発生するため好中球は口腔粘膜炎の部位に蓄積すると考えられている。口腔粘膜の状態の改善は、感染症または粘膜炎からの口腔粘膜の回復を反映し、したがって好中球産生能の回復を反映するはずであり患者の造血機能の回復を反映すると考えられた。

造血幹細胞からの成熟血液細胞の発達は、血流に現れるまでに通常 7~14 日、平均 11.4 日かかる。好中球の発達に関しては、同位体標識データから

推定される平均骨髓通過/有糸分裂後の時間は 5.80 ± 0.42 日である。BMA は、さまざまな成熟段階での骨髓細胞の状態に関する最も早い時期に情報を提供することが可能であり、非常に有益である。

OME 細胞は、性別不一致の HSCT 後のキメラ現象分析にも有用であることが判明した。OME 細胞がキメラ現象を示した理由については、上皮細胞は、一般に造血幹細胞から発生するとは考えられていないが、複数の報告によりドナー型細胞は上皮細胞、肝細胞、肺細胞を含むさまざまな組織、器官に存在することが、示されている。造血幹細胞が、直接上皮細胞に移行する可能性を排除することはできないが、上皮細胞は、*in vivo* と *in vitro* の両方で、間葉系幹細胞 (MSC) から移行する可能性も否定できない。一方で、HSCT 患者に出現したドナー型 OME 細胞は、BMA に含まれる MSC、動員された末梢血または HSCT に使用された臍帯血から発生した可能性もある。

OME 細胞を用いたキメラ現象分析は、フォローアップ期間中の遅発性移植片生着不全や再発をモニタリングするための良い方法である。

本研究の症例 16、症例 21 では、患者は口腔粘膜の状態のわずかな変化以外は再発の兆候を示さなかった。再発の臨床的兆候がない段階では通常、骨髓穿刺やキメラ現象の分析は行うことはない。しかし、口腔ケアにより患者の口腔粘膜のわずかな変化に気づいたことからキメラ現象分析を行い、再発の早期発見と治療につながった。

上記のように造血幹細胞移植において、1) OME 擦過細胞診の光学顕微鏡観察と組み合わせた視覚による診査は、HSCT 後の生着の迅速な検出のための信頼できる方法であり、2) OME 擦過細胞診および非侵襲的キメラ現象分析は、HSCT 後のフォローアップモニタリングに、役立つと考えられた。

HSCT を実施する医療チームは、HSCT 後に適切な口腔ケアを通じて口腔粘膜の状態を注意深く観察することが推奨される。また、歯科医師、歯科衛生士教育においても移植後の口腔ケア時に経時的な粘膜の変化の観察の重要性について写真等で明示して理解を促すことも必要と考える。

V. 結論

1) OME 擦過細胞診は性別に関係なく従来のマーカーである ANC ($> 500 /$

μL) よりも早期に生着を予測できた。

2) 性別が一致しない場合には、OME 擦過細胞で XY-FISH を実行することで生着後の再発や、遅発性生着不全のスクリーニングに有用であった。

HSCT を実施する医療チームは、従来のマーカーである BMA による FISH 分析や ANC のみでなく、新たな生着のモニタリング法として、口腔粘膜の状態の変化と OME 擦過細胞診を加えるべきと考えた。