

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 787 号	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、難治性の血液疾患や白血病などの血液悪性腫瘍の最も有望な治療法であり、正常な造血を回復するために使用される。ただし、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いる。これは、HSCT の成功、ひいては患者の生存期間にとって重要である。

20 年間程前から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、骨髄破壊的前処置と免疫抑制療法により患者が免疫不全状態になるため、HSCT 後の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。HSCT 後に発生する口腔粘膜炎は、緑色連鎖球菌による菌血症および敗血症の潜在的な原因となりうる。

私たちは HSCT 治療中の口腔より感染を防止するため、口腔ケアチームとして患者がバイオフィームに入る少なくとも 2 週間前から、週に 3 回、患者に口腔ケアを提供している。このような日々の臨床の中で、HSCT で治療された症例では、ほとんどの場合、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。そこで、HSCT 後、患者の口腔粘膜の状態を詳しく観察していくと、口腔粘膜の改善と並行して、口腔粘膜への好中球の蓄積が口腔粘膜上皮 (OME) のパパニコロウ染色による細胞診で確認された。このような患者ではその後同様に、これらの生着の有無の確定のために行う骨髄穿刺検査 (BMA) のキメラ現象分析によっても確認された。このことにより本知見は HSCT の治療経過判定における新たなマーカーとなり得ると判断した。従来、好中球数 (ANC) が 3 日連続で $500 / \mu\text{L}$ に達すると、生着が確認される。

その後、口腔ケアにおける口腔粘膜の詳しい観察によって、OME 細胞の周りの好中球の蓄積を伴う可能性が最も高い口腔粘膜の状態の改善が、ANC によって確認された生着よりも数日先行することがわかった。即ち BMA の如き生体への侵襲が無く且つ早期の生着判断の新たなマーカー

一になりうると考えられた。

そこで、口腔粘膜における患者型細胞のドナー型細胞への置換が、口腔粘膜の状態の視覚的改善に影響を与えるという別の可能性を探求するために、それらの患者の OME 細胞のキメラ現象分析を試みた。

通常は、移植後に血液内科の医師により治療は、BMA のキメラ現象分析を行って、生着、移植片対宿主病、および移植の失敗または原発性疾患の再発についてモニタリングを行っている。

BMA は、さまざまな成熟段階での未成熟および成熟血液細胞の分布に関する直接的な情報を得ることができるので BMA は、HSCT 後の生着の有無を判定するためのより優れた検査であると考えられている。一方、X および Y 染色体特異的プローブ (XY-FISH) に基づく蛍光 insitu ハイブリダイゼーション分析は、感度が高いため、性別が一致しない幹細胞移植の場合に使用される。

予備的研究によって、この XY-FISH は、OME の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を調査するために、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。

本論文では、HSCT 後に発生する OME 細胞のキメラ現象が、本研究により明らかになった事を報告する。

一方で、OME 細胞のキメラ現象は、口腔粘膜の視覚的改善とは相関していないが、BMA の状態の変化を反映していたと思われる。HSCT 患者への口腔ケアに対して、口腔ケアチームによる口腔の視覚による検査も、HSCT 後のフォローアップに、非常に役立つことが示唆された。

OME の状態の変化は、レシピエントの造血系の状態の変化を反映している可能性がある。

これまでに、口腔ケアチームによる口腔の観察によって、急性骨髄性白血病 (AML) の再発が、早期に発見された数例を経験した。口腔の視覚的な観察で、再発の兆候が見られた患者の OME 細胞を、用いて XY-FISH を実施した結果、再発が確認された。その後、血液内科においても BMA を実施して AML の再発が確認された。ここでは、HSCT 後のフォローアップの項目に口腔の視覚的観察を追加し、予期しない所見が、観察された場合に、キメラ現象分析を行うことまた、性別が一致しない HSCT の場合、侵襲的検査を行う前に、一次スクリーニング検査として、非侵襲的に得られた、OME 細胞に対してキメラ現象分析を行うことの有用性についても検討した。

II. 材料および方法

1. 対象

2010 年以降に、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。調査は、臨床検査の結果を含め、患者の医療記録から、遡及的にデータを収集した。年齢、性別、原発性疾患の名前、プレコンディショニングレジメンのカテゴリー、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。(表 1) 本研究は、がん感染症センター都立駒込病院の施設内審査委員会 (承認番号 838) および東京都立大学荒川キャンパス研究安全委員会 (承認番号 11042) の承認を得て実施された。調査はヘルシンキ宣言と、その後の改正に従って実施された。

2. 生着の決定

HSCT 後の生着を決定するには従来は、骨髄穿刺検査と血液検査をマーカーとして使用している。この方法は、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

する。今回の研究においても、生着日の特定にこの方法を採用し実施し、HSCT 後の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、入院中、および HSCT が成功した後の退院後の通院時に、歯科衛生士によって週に 3 回実施した。口腔内写真は、プレコンディショニングレジメンの前後、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撮影を行った。撮影された口腔内の領域は、左右の頬粘膜と舌、口蓋、口腔底であった。

4. 擦過細胞診のサンプル

擦過細胞診のサンプルは、HSCT 患者から採取した。左右の頬粘膜と口蓋、口腔底をそれぞれ使い捨ての子宮頸部細胞診ブラシ (Honest Medical, 子宮頸部ブラシタイプ S; Honest Medical,、東京、日本) を用いて擦過しスライドガラスに塗布した。

サンプルは 95% (vol/vol) エタノールに浸漬し、15 分間湿式固定した後パパニコロウ染色を行った。

FISH 分析では、エタノールで固定した塗抹標本を風乾し、SRL Inc. (東京、日本) に依頼した。

サンプルは、プレコンディショニングレジメンの前後、免疫抑制レジメンの後、及び、口腔粘膜の状態の改善が、検出された時、並びに BMA 施行日に採取した。

5. 骨髄穿刺検査

骨髄穿刺検査は、腸骨よりサンプルを採取し、FISH 分析を行う。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、実施し染色されたサンプルは、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 セルの両方が、SRLInc. 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、平均骨髄通過/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髄細胞の状態に関する最も早い時期に情報を提供する事が可能であり、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 擦過細胞診により、従来のマーカーである、ANC ($> 500 / \mu\text{L}$) よりも早期に生着を予測できる。

2) 性別が一致しない、HSCT を使用した場合、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、口腔ケアチームと連携し、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し変化が見られた時は、躊躇なく OME の擦過細胞診を行うことが推奨される。