

- Harada M:Hospital capacity and post-transplant survival after allogeneic bone marrow transplantation: analysis of data from the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant* (2000) 26:1061-1067
- 17) Takenaka K, Shinagawa K, Sunami K, Fujii N, Hiramatsu Y, Maeda Y, Nawa Y, Katayama Y, Teshima T, Ishimaru F, Kiura K, Ideda K, Harada M:Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in 23 adult patients with hematologic malignancies:A single-center experience. *Int J Hematol* (2000) 72:362-370
- 18) Mori T., Okamoto S., Matsuoka S., Yajima T., Wakui M., Watanabe R., Ishida A., Iwao Y., Mukai M., Hibi T., Ikeda Y. : Risk-adapted pre-emptive therapy for cytomegalovirus disease in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 25:765-769, 2000.
- 19)Mori T., Okamoto S., Kuramochi S., Ikeda Y. : An adult patient with hypersensitivity to mosquito bites developing mantle cell lymphoma. *International Journal of Hematology* 71: 259-262, 2000.
- 20) Ohashi K., Tanabe J., Watanabe R., Tanaka T., Sakamaki H., Maruta A., Okamoto S.,Aotsuka N., Saito K., Nishimura M., Oh H., Matsuzaki M., Takahashi S., Yonekura S.:The Japanese multicenter open randomized trial of ursodeoxycholic acid prophylaxis for hepatic veno-occlusive disease after stem cell transplantation. *American Journal of Hematology* 64: 32-38, 2000.
- 21) Mori T., Sato N., Watanabe R., Okamoto S., Ikeda Y.: Erythema exsudativum multiforme induced by granulocyte colony-stimulating factor in an allogeneic peripheral blood stem cell donor.*Bone Marrow Transplantation* 26: 239-240, 2000.
- 22) Ando M, Yokozawa T, Sawada J, Takaue Y, Togitani K, Kawahigashi N, Narabayashi M, Takeyama K, Tanosaki R, Mineishi S, Kobayashi Y, Watanabe T, Adachi I, Tobinai K: Cardiac conduction abnormalities in patients with breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 25:185-189, 2000.
- 23)Kawano K, Miyazaki T, Watanabe T, Suzue A, Kan-nuki S, Kagechi T, Onishi T, Kaneko M, Kanamaru S, Wakata Y, Nakagawa R, Suenaga K, Suzuya H, Abe T, Nagahiro S, Kuroda Y, Takaue T: HLA-mismatched CD34-selected stem cell transplant complicated by HHV-6 reactivation in the central nervous system. *Bone Marrow Transplant* 25:787-790, 2000.
- 24) Wu M-S, Tani K, Asano S, et al.: MHC (Major Histocompatibility Complex) -DRB Genes and Polymorphisms in Common Marmoset. *J.Mol Evol* (in press)
- 25) Tanabe T, Kuwabara T, Asano S, et al.: Suppression of progression of chronic myelogenous leukemia in mice by an allosterically controlled ribozyme. *Nature* 2000 406:473-474.
- 26) Hase, H, Tani K. Asano S, et al. : Case Report: The availability of TCR-V_β repertoires analysis with RT-PCR methods for the early

- detection of pulmonary relapsed T-cell malignancy after the autologous stem cell transplantation. *Am J Hematol* 2000 64:124-7.
- 27) Watari K, Tojo A, Asano S, et al. : Identification of a melanoma antigen, PRAME, as a BCR/ABL-inducible gene. *FEBS lett* 2000 466:367-371
- 28) Tanabe T, Takata I, Asano S, et al.: Maxizyme, novel allosterically controllable ribozymes, can be designed to cleave various substrates. *Biomacromolecules* 2000 1:108-117.
- 29) Machida U, Tojo A, Asano S, et al.: Refractory facial cellulitis following cosmetic rhinoplasty after cord blood stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 2000 72:98-100.
- 30) Machida U, Tojo A., Asano S, et al. : The effect of G-CSF administration in healthy donors before bone marrow harvesting. *Br J Haematol.* 2000 108:747-53.
- 31) Watari K, Tojo A, Asano S, et al.: Hyperfunction of neutrophils in a BCR/ABL-negative chronic myeloid leukemia: A case report with in vitro studies. *Cancer* 2000 89:551-560.
- 32) Nagayama H, Sato K, Asano S, et al.: IL-12 responsiveness and expression of IL-12 receptor in human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2000 165:59-66.
- 33) Kosugi N, Tojo A, Asano S, et al.: The preferential expression of CD7 and CD34 in myeloid blast crisis in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2000 95:2188-9
- 34) Misawa K, Nosaka T, Asano S, et al.: A method to identify cDNAs based on localization of green fluorescent protein fusion products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 97:3062-6.
- 35) Oshima Y, Tojo A, Asano S, et al.: Biological activity of human granulocyte colony stimulating factor with a modified C-terminus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 267:924-7.
- 36) Futaki M, Yamashita T, Asano S, et al. : The IVS4 + 4 A to T mutation of the fanconi anemia gene FANCC is not associated with a severe phenotype in Japanese patients. *Blood.* 2000 95:1493-8.
- 37) Itoh K, Ohtsu T, Sasaki Y, Ogura M, Morishima Y (他 15 名): Randomized comparison of mobilization kinetics of circulating CD34+ cells between biweekly CHOP and dose-escalated CHOP with the prophylactic use of lenograstim (glycosylated rHuG-CSF) in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 38: 521-532, (2000).
- 38) Yano K, Kanie T, Okamoto S, Kojima H , Morishima Y(他 11 名、13 番目): Quality of life in adult patients after stem cell transplantation. *Int. J. Hematol.* 71: 283-289, (2000).
- 39) Yatabe Y, Suzuki R, Tobinai K, Morishima Y(他 11 名、11 番目): Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood* 95: 2253-2261, (2000).

- 40) Fukui Y, Oono T, Cabaniols JP, Nakao K, Hirokawa K, Inayoshi A, Sanui T, Kanellopoulos J, Iwata E, Noda M, Katsuki M, Kourilsky P, Sasazuki T. Diversity of T cell repertoire shaped by a single peptide ligand is critically affected by its amino acid residue at a T cell receptor contact. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25): 13760-5., 2000.
- 41) Ries S, Biederer C, Woods D, Shifman O, Shirasawa S, Sasazuki T, McMahon M, Oren M, McCormick F. Opposing effects of Ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF. *Cell* 103(2): 321-30., 2000.
- 42) Shirasawa S, Arata A, Onimaru H, Roth KA, Brown GA, Horning S, Arata S, Okumura K, Sasazuki T, Korsmeyer SJ. RnX deficiency results in congenital central hypoventilation. *Nat Genet* 24(3): 287-90., 2000.
- 43) Akesaka T, Kashiwase K, Shimamura M, Ishikawa Y, Tanaka H, Fujii M, Akaza T, Hando K, Yuasa S, Takahashi T, Juji T: Identification of a novel HLA-B46 allele, B*4602, in Japanese : *Tissue Antigens* 55:460-2., 2000.
- 44) Shiina T, Kikkawa E, Iwasaki H, Kaneko M, Narimatsu H, Sasaki K, Bahram S, Inoko H : The beta 1,3-galactosyl transferase-4 (B3GALT4) gene is located in the centromeric segment of the human MHC class II region. *Immunogenetics* 51 : 75-78, 2000.
- 45) Gao PS, Kawada H, Kasamatsu T, Mao XQ, Roberts MH, Miyamoto Y, Yoshimura M, Saitoh H, Yasue H, Nakao K, Adra CN, Kun JF, Moro-oka S, Inoko H, Ho LP, Shirakawa T, Hopkin JM : Variants of NOS1, NOS2 and NOS3 genes in Asthmatics. *Biochem Biophys Res Commun* 267 : 761-763, 2000.
- 46) Teraoka Y, Naruse TK, Oka A, Matsuzawa Y, Shiina T, Iizuka M, Iwashita K, Ozawa A, Inoko H : Genetic polymorphisms in the cell growth regulated gene, SC1 telomeric of the HLA-C gene and lack of association with psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens* 55 : 206-211, 2000.
- 47) Dai KZ, Vergnaud G, Ando A, Inoko H, Spurkland : The SH2D2A gene encoding the T-cell-specific adapter protein (TSA) is localized centromeric to the CD1 gene cluster on human chromosome 1. *Immunogenetics* 51 : 179-185, 2000.
- 48) Keicho N, Ohashi J, Tamiya G, Nakata K, Taguchi Y, Azuma A, Ohishi N, Emi M, Park H, Inoko H, Tokunaga K, Kudoh S : Fine localization of a major disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Am J Hum Genet* 66 : 501-507, 2000.
- 49) Kawamura K, Yamamura T, Yokoyama K, Chui DH, Fukui Y, Sasazuki T, Inoko H, David CS, Tabira T : Induction of autoimmune encephalitis by proteolipid protein 95-116-specific T cells from HLA-DR2 (DRB1*1502) transgenic mice. *J Clinical Investigation* 105 : 977-984, 2000.
- 50) Ikewaki I, Tamauti H, Yamada A, Mori N, Yamao H, Inoue H, Inoko H : A unique monoclonal antibody mNI-11 rapidly enhances spread formation in human umbilical vein endothelial cells. *J Clinical Immunology* 20 : 317-324, 2000.
- 51) Yabuki K, Inoko H, Ohno S : HLA testing

- in patients with uveitis. *Int Ophthalmol Clin.* 40 : 19-35, 2000.
- 52) Kobayashi T, Yokoyama I, Inoko H, Naruse T, Hayashi S, Morozumi K, Uchida K, Nakao A: Significance of transporter associated with antigen processing 2 (TAP2) gene polymorphism in living-related renal transplantation. *Human Immunol* 61 : 670-674, 2000.
- 53) Watanabe Y, Tenzen T, Nagasaka Y, Inoko H, Ikemura T : Replication timing of the human X-inactivation center (XIC) region : correlation with chromosome bands. *Gene* 252 : 163-172, 2000.
- 54) Naruse TK, Mastuzawa Y, Ota M, Kastuyama Y, Matsumori A, Hara M, Nagai S, Morimoto S, Sasayama S, Inoko H : HLA-DQ1*0601 is primarily associated with the susceptibility to cardiac sarcoidosis. *Tissue Antigens* 56 : 52-57, 2000.
- 55) Iwasaki M, Kobayashi K, Suzuki K, Anan S, Ohno S, Geneg GL, Inoko H : Polymorphism of the ABO blood group genes in Hans, Kazak and Uygur populations in the Silk Route of northwestern China. *Tissue Antigens* 56 : 136-142, 2000.
- 56) Niizeki H, Naruse T, Hashigucci K, Yokoyama M, Yamasaki Y, Akiya K, Tojo T, Urushibara T, Yamazaki Y, Inoko H, Nishikawa T : Polymorphisms in the TNFA promoter region is not associated with palmoplantar pustulosis. *Tissue Antigens* 56 : 162-165, 2000.
- 57) Ota M, Bahram S, Katsuyama Y, Saito S, Nose Y, Sada M, Ando H, Inoko H: On the MICA deleted-MICB null, HLA-B4801 haplotype. *Tissue Antigens* 56 : 268-27, 2000.
- 58) Kuwana M, Kaburaki J, Pandey JP, Murata Y, Kawakami Y, Inoko H, Ikeda Y: HLA class II alleles in Japanese patients with immune thrombocytopenic purpura. Associations with anti-platelet glycoprotein autoantibodies and responses to splenectomy. *Tissue Antigens* 56 : 337-343, 2000.
- 59) Kimura A, Ota M, Kastuyama Y, Ohbuchi N, Takahashi M, Kobayashi Y, Inoko H, Numano F : Mapping of the HLA-linked genes controlling the susceptibility to Takayasu's arteritis. *Int J Cardiology* 75 : S105-S110, 2000.
- 60) Mizuki N, Ota M, Yabuki K, Katsuyama Y, Ando H, Palimeris GD, Kaklamani E, Accorinti M, Pivetti-Pezzi P, Ohno S, Inoko H : Localization of the pathogenic gene of Behcet's disease by microsatellite analysis of three different populations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 3702-3708, 2000.
- 61) Matsuzaka Y, Makino S, Nakajima K, Tomizawa M, Oka A, Kimura M, Bahram S, Tamiya G, Inoko H: New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class II region. *Tissue Antigens* 56 : 492-500, 2000.
- 62) Saito S, Ota S, Yamada E, Inoko H, Ota M : Allele frequencies and haplotypic associations defined by allelic DNA typing at HLA class I and class II loci in the Japanese population. *Tissue Antigens* 56 : 522-529, 2000.
- 63) Koike T, Tsutsumi A, Ichikawa K, Kasahara H, Yasuda S, Matsura E.: Antophospholipid

- antibodies:clinical significance and pathogenesis. New frontier in Vascular biology;thrombosis and hemostasis offprint issue. 125-138. 2000.
- 64) Tsutsumi,A.,Ichikawa,K.,Matsura,E., Sawada,K.,Koike T.:Heterogeneous behavior anti- β 2-glycoprotein. The J. Rheumatol. 72:2. 391-397.2000.
- 65) Bertolaccini,M.L,Atsumi,T.,Caliz,A.R., Amengual,O.,Khamashta,M.A.,Huges,G.R.V., Koike,T.:Associationofantiphospholipidylserine/prothombin autoantibodies with HLA class II genes. Arthritis&Rheum.43:3. 683-688.2000.
- 66)Matsura,E., Koike T.: Accelerated atheroma andanti- β 2-glycoprotein I antibodies. Lupus. 9:210-216.2000.
- 67) Ieko,M.,Ichikawa,K.,Atsumi,T.,Takeuchi,R., Sawada,K.,Yasukouchi,T.,Koike,T. : Effects of β 2-glycoprotein I and monoclonal anticardiolipin antibodies on extrinsic fibrinolysis. Seminars in Thrombosis and Hemostasis. 26:1. 85-90. 2000.
- 68)Atsumi,T.,Koike,T. Cardiac valve diseases and antiphospholipid syndrome. Int.med. 39:6.446-447.2000.
- 69)Takeda,t.,Mizugaki,Y.,Matsubara,L.,Imai,S. Kioke,T.: Lytic epstein-barr virus infection in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. Arthritis.Rheum. 43:6. 1218-1225.2000.
- 70) Tsutsumi,A.,Koike,T.: Antiphospholipid syndrome in the elderly. Int.Med. 39:7.529-530.2000.
- 71) Matsuura,E.,Inagaki,J.,Kasahara,H., Ymamoto,D.,Atsumi,T.,Kobayashi,K.,Kaiharu,K., hao,D.,Ichikawa,K.,Tsutsumi,A.,Yasuda,T., Triplett.A.D.,Koike,T.: Proteolytic cleavage of β 2-glycoprotein I: reduction of antigenicity and the structural relationship. Internal. Immunol. 12:8.1183-1192. 2000.
- 72)Takeuti,R.,Atsumi,T.,Ieko,M.,Takeya,H., Yasuda.,Ichikawa,S.,Tsutsumi,A.,Suzuki,K., Koike,T. : Coagulation and fibrinolytic activities in 2siblings with β 2-glycoprotein I deficiency. Blood. 96:4. 2000.
- 73) Yasuda,S.,Tsutsumi,A.,Chiba,H.,Yanai,H.,Miyoshi,Y.,Takeuchi,R.,Horita,T.,Atsumi,T., Ichikawa,K.,Matsuura,E.,Koike,T. : β 2-blycoprotein I deficiency: prevalence, genetic background and effects on plasma lipoprotein metabolism and hemostasis. Atherosclerosis.152:337-346. 2000.
- 74)Atsumi,T.,Ieko,M.,Bertolaccini,M.L.,Ichikawa,K., Tsutsumi,A.,Matsuura,E.,Koike,T. : Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-proteronbin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. Arthritis Rheumatism.43:9. 1982-1993.2000.
- 75)Koizumi,K.,Nishio,M.,Endo,T.,Takashima,H.,Haseyama,Y.,FujimotoK.,Ymamoto,S.,Sato,N.,Ikebuchi,K.,Ikeda,H.,Koike,T.,Sawada,K.:Large scale purification of human blood CD34+ cells from cryopreserved peripheral blood stem cells,using a nylon-fiber syringe system and immunomagnetic microspheres. Bone Marrow Transplantation. 26. 787-793. 2000.
- 76)Takeuchi,M.,Bucala,L.,Suzuki,T.,Ohkubo,T.,Yamazaki,M.,Koike,T.,Kameda,Y.,Makita,

Z.: Neurotoxicity of advanced glycation end-products cultured cortical neurons. J.neuropathol.exp.Neurology. 59:12.1094-1105.2000.

77) Takeuchi, M., Makita, Z., Bucala, L., Suzuki, T., Koike, T., Kameda, Y. : Immunological evidence that non-carboxymethyllysine advanced glycation end-products are produced from short chain sugars and dicarbonyl compounds in vivo. Molecular medicine. 6:2.114-125.2000.

78) Subang, R., Levine, J.S., Janoff, A.S., Davidson S. M. K., Taraschi, T. F., Koike, T., Minchey, S.R., Whiteside, M., Tannenbaum, M., Rauch, J.: Phospholipid-bound glycoprotein L induces the production of anti-phospholipid antibodies. J.autoimm. 15.21-32.2000.

79) Koike, T., Ichikawa K., Atsumi, T., Kasahara, H., Mastura, E.: β 2-glycoprotein I -anti- β 2-glycoprotein I Interaction. J.autoimm. 15.97-100.2000.

80) Sasaki, K., Tsutsumi, A., Wakamiya, K., Ohtani, K., Suzuki, Y., Watanabe, Y., Nakayama, N., Koike, T.: Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection. Scand J.gastroenterol.9.961-965.2000.

81) 高山信之, 岡本真一郎: CMLの造血幹細胞移植. 臨床血液41 (4) : 283-287, 2000.

2. 学会発表

1) 熱田由子、大庭拓、寺倉精太郎、西田徹也、笠井雅信、濱口元洋、小寺良尚: 単一施設における血縁者間同種末梢血幹細胞移植の治療成績 第23回細胞移植学会総会 京都 2000.12

2) 原田実根: 末梢血幹細胞移植の臨床 第20回日本臨床血液学会招請講演 2000.11

3) Okamoto, S.: International Challenges in Transplantation, The Council Meeting of National Marrow Donor Program (NMDP), Minneapolis, USA, 2000.9

4) Takaue, Y.: Mini-transplantation for solid tumors. Recent Advances in Hematopoietic Stem Cell Transplantation; Clinical Progress, New Technologies and Gene Therapy, San Diego, March, 2001.3

5) Iseki, T., Ochi, J., Nagayama, H., Tomonari, A., Tojo, A., Tani, K., Asano, S.: Stem cell transplantation from peripheral blood cells. International Symposium on the Criticality Accidentin Tokaimura, Chiba, Japan, 2000.12

6) Sasazuki, T.: How TCR-MHC peptide interaction determines the fate of T cells. US-Japan and German-Japan Joint Immunology Meeting 2000, 2000.11

7) 坂井美紀、徳永勝士、石川善英、柏瀬貢一、田中秀則、中島文明、赤座達也、十字猛夫: Multiplex PCR法を用いた MIC-A deletion の検出と東アジアにおける MIC-A-MIC-B null ハプロタイプの分布と進化 第9回日本組織適合性学会総会 2000

8) 牧野悟史、岡本浩一、林英樹、徳保江里子、渡辺裕美、遠藤高帆、今西規、五条堀孝、田宮元、猪子英俊: ゲノムワイドな多型マイクロサテライトマーカーの設定 第23回日本分子生物学会年会 神戸 2000

9) Koike, T.: β 2-glycoprotein I-anti- β 2-glycoprotein I Interaction. 9th International Symposium on Antiphospholipid Antibodies.,

Tours, France, 2000.9

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

IV. 平成12年度分担研究報告書

IV. テーマー 1

造血細胞移植から細胞治療へ

厚生科学研究費補助金ヒトゲノム・再生医療等研究事業

分担研究報告書

造血細胞の自己修復能力、再生能力を利用した治療法の開発と普及に関する研究

分担研究課題：DLTと細胞治療に関する研究

分担研究者 小寺良尚 名古屋第一赤十字病院 骨髓移植センターセンター長

研究協力者 塩原信太郎 金沢大学医学部附属病院 輸血部助教授
吉田 喬 富山県立中央病院 内科部長
小島勢二 名古屋大学大学院医学研究科 発育加齢医学教授
佐尾 浩 名鉄病院 内科部長
伊藤仁也 旭川医科大学 小児科助手
関根[□]軍彬 リンフォテック株式会社 代表者
濱口元洋 名古屋第一赤十字病院 第四内科副部長
北折健次郎 名古屋第一赤十字病院 第四内科副部長
笠井雅信 名古屋第一赤十字病院 第四内科医員
西田徹也 名古屋第一赤十字病院 第四内科医員
熱田由子 名古屋第一赤十字病院 第四内科医員
寺倉精太郎 名古屋第一赤十字病院 第四内科医員
大庭拓也 名古屋第一赤十字病院 第四内科医員
松山孝治 名古屋第一赤十字病院 小児血液腫瘍科部長
加藤剛二 名古屋第一赤十字病院 小児血液腫瘍科副部長

研究要旨：

DLTと細胞治療の初期モデルとして、再生不良性貧血に対する非血縁者間骨髓移植後に発症頻度が高いEBV-LPDに対し、非血縁ドナーからのDLTを2例実施し、その有用性を確認した。リンパ球の標的細胞障害活性を非アイソトープ的に測定するEu-DTPAおよびLDHリリースアッセイの基礎的検討を行なった。Ex vivoにおいて増殖、活性化させたCD4陽性細胞によるDLTを実施しその有用性を確認した。我が国の造血細胞移植の現状を解析し、潜在需要並びに移植成績向上のための問題点を明らかにした。末梢血幹細胞ドナーの安全性に関する文献学的考察を日本造血細胞移植学会との共同作業として行ない、8例の死亡例を確認するとともに、これら死亡例は全て非健常者（有病者）であることを明らかにした。

A. 研究目的：

1. DLTは同種骨髄移植後の再発白血病やEBV-LPDに対し再び治癒を望み得る治療法として今年度より健康保険適用医療となった。DLTは骨髄ドナー末梢血中のリンパ球分画を未操作で輸注するという、細胞を用いた治療の最もprimitiveな形のものであるが、それだけに体外操作する際に問題となる様々な規準の枠外にあり、現実的且つcost-benefitの高い治療法になるものと考えられる。今回は200cc前後の全血提供で済むことから、非血縁ドナーからも同意の得られやすい、EBV-LPDに対するDLTを細胞治療の初期モデルとして位置づけ、その可能性と限界につき検討する。
2. DLTを血縁、非血縁者間同種造血幹細胞移植例において実践して行く中で、そのエフェクター細胞を同定する。
3. DLTの作用機序の検討に必要なリンパ球の標的細胞障害試験において、ベッドサイドでも可能な非アイソトープ性アッセイ法を開発する。
4. 従来のDLTでは効果が不十分である急性白血病の移植後再発に対し、Ex vivo活性化CD4陽性細胞によるDLTを試みる。
5. 我が国の造血細胞移植の現状を解析し更なる成績向上に必要な要因を明らかにする。
6. 海外で末梢血幹細胞ドナーにおける死亡事例が散発的に報告されているので、情報を整理し、その背景因子を明らかにすることにより、今後の同ドナーの安全性に資する。

B. 研究方法：

1. 通常のDLTは骨髄移植推進財団を介し

て得られる非血縁ドナー由来の全血 100～200cc より、Ficoll 法により単核球を分離し数バイアルに分注、-196℃に凍結保存し、必要に応じて用いた。

2. CML 移植後再発例に対し実施した DLT 後、末梢血、骨髄中の T 細胞レパトアを CDR3spectratyping 法により解析した。

3. 非放射性物質 Eu-DTPA を用いた細胞障害活性測定法および LDH release assay を用いて細胞障害性 T リンパ球 (CTL) 活性および NK 細胞活性を測定した。

4. 幹細胞ドナー由来の ex vivo 活性化 T 細胞を用いた DLT を実施するために、ドナー末梢血 20cc を Ficoll 比重遠沈法により単核球に分離後、OKT3 固相化フラスコを用い 700U/mL IL-2 添加 RPMI 中にて 3 日間培養、magnet immunobeads 法にて CD4 陽性細胞に分離した後さらに活性化培養を 2 日間継続し、次に CD4 陽性細胞をガス透過性バッグに移し、175U/mL IL-2 添加 AIM 培地にて 6～8 日間培養、輸注細胞数の目安を 5×10^7 /Kg とし約 1000 倍に増幅した。輸注前には安全試験として細菌培養試験およびエンドトキソの定量を行ない、合格したものを投与することとした。

5. 日本造血細胞移植学会、骨髄移植推進財団から開示されたデータを解析した。

6. 海外文献並びに日本造血細胞移植学会 PBSCT 小委員会を介して得た同種末梢血幹細胞ドナーに関する有害事象報告を解析した。(倫理面への配慮)

臨床試験の実施に当ってはプロトコールを定め実施施設の倫理委員会の承認を得るとともに、患者、ドナーの同意を文書で取得した後行なっている。各種造血細胞移植療法の成績等その可能性と限界については、造血細胞移

植学会、骨髄移植推進財団等からのデータを逐一情報開示している。

C. 研究結果：

1. 非血縁者間骨髄移植例後 EBV-LPD を発症した 2 例の再生不良性貧血に対し、骨髄ドナーから再度提供を受けた末梢血リンパ球による DLT は 2 例とも有用であり、患者は社会復帰出来た（表—1～6、図—1～3）。
2. CML 移植後再発例に対し実施した DLT 後、末梢血、骨髄中の T 細胞レパトアを解析し、BV24 陽性 T 細胞のクローン性増殖が、初めは末梢血に、その後骨髄に見られる事を明らかにした。この T 細胞クローンは Ph 染色体陽性細胞（腫瘍細胞）が DLT 効果により消失するとともに減少し、腫瘍細胞が残存すると持続することから、DLT のエフェクター細胞である可能性が示唆された。
3. 白血病細胞株および状態のよい保存白血病細胞で標識細胞を得ることが LDH release assay において可能であった。また、K562 および Raji にたいする IL2 activated T cell の細胞障害活性を安定して測定できた（表—7、8）。
4. 血縁ドナーの CD-4 陽性 T 細胞を、IL-2 を含む固相培地で 6～8 日間に 1000 倍に増幅した活性化 T 細胞による移植後再発急性白血病の治療が行なわれ、重篤な GVHD を併発する事無く寛解を得る事が出来、DLT より効果的で且つ適応疾患が広く、より安全な細胞治療法になる可能性が示された（図—4）。
5. 我が国における造血細胞移植年間実施例数は約 2,000 例、累積症例数は約 12,000 例になっていることが明らかになった。しかしこれらは対象となる疾患の年間発生

率から年齢や他の治療法で治癒する症例数を考慮にいれて試算した造血細胞移植の潜在需要の半数にも達しておらず、多様な造血幹細胞移植療法総体としての供給率の向上が必要であることが明らかになった。又、1992 年から 2000 年の間に、計 3000 例行われた非血縁者間骨髄移植例の内、初期の 500 例の、死因の解析より、拒絶、GVHD、原病再発以外に、血栓性微小循環障害、VOD などから構成される TRM (Transplant Related Mortality、又は Therapy Related Mortality) の制御が成績向上のためには必要であることが示された（表—9～12、図—5～8）。

6. 海外において 7～8 例の同種末梢血幹細胞ドナーの死亡例があることが、文献学的に確認された。しかしドナーはいずれも何らかの疾病状態にあり、そのことが末梢血幹細胞提供直後の死亡に繋がったものと考えられた（添付資料—1）。

D. 考察：

造血幹細胞移植後の合併症である EBV-LPD や原病再発に対して行われてきた DLT は、造血幹細胞とリンパ球系細胞のソース（ドナー）が同一であるので、輸血後 GVHD に見られるような骨髄抑制は無く、且つ患者とドナーの HLA が適合しているという条件下においては、GVHD も多くは制御範囲内であって有用な治療法であり、プリミティブではあるが、腫瘍に対する細胞治療として位置づけられると考える。そしてこの未操作リンパ球を用いた DLT の発展型としての ex vivo 活性化、増幅 CD4 陽性細胞による DLT は、ドナーの末梢血約 10-20cc から得られるリンパ球を基に、従来の

DLT以上の治療効果を、GVHDなどの副作用を増強させること無く挙げる事が出来る可能性が在り、再生医療研究の成果の一つになるものと思われる。又、こうした再生医療の一つのモデルとしての造血細胞移植療法の更なる発展のためには、移植関連合併症の制御と、ドナーの安全性に関する情報の絶えざる蓄積が必要であると考ええる。

E. 結論

造血幹細胞移植から派生した DLT は移植後再発白血病や EBV-LPD に対し再び治療を望み得る治療法として定着し、第二世代の DLT とも言うべき活性化 CD4 細胞による DLT への道を開きつつある。血縁者間における同種末梢血幹細胞移植の急速な普及は、ドナーにおける安全性を確保するための条件設定を容易にし、同法の非血縁者間移植への応用時期を早めるものと思われる。

F. 健康危険情報

同種末梢血幹細胞ドナーに関する有害事象につき海外情報をも含めた文献学的検討を行なった結果、海外において少なくとも 8 例の死亡事例が存在する事が明らかになった。ドナーはいずれも有病者であり、肉親を救うためドナーになったものと思われ、同種造血細胞移植ドナーは健常者でなければならないとする原則を逸脱したものであった。我が国で行われた 2000 年度一年間の 683 例の同種末梢血幹細胞ドナーには幸い生命予後に関するような有害事象は報告されていないが、今後我が国でも十分起こり得る事であるのでここに報告する(添付資料-1 参照)。尚、本件に関しては本

年 2 月に、日本造血細胞移植学会から全国約 1,200 の同種末梢血幹細胞移植実施施設(含実施予定施設)に緊急案全情報として通知された。

F. 研究発表

1. 論文発表:

1) Yokozawa T, Towatari M, Iida H, Takeyama, K, Tanimoto M, Kiyoi H, Motoji T, Asou N, Saito K, Takeuchi M, Kobayashi Y, Miyawaki S, Kodera Y, Ohno R, Saito H and Naoe T for Japan adult leukemia study group: Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27^{kip1} in acute myeloid leukemia. *Leukemia.*, 14 : 28-33, 2000

2) Iida H, Towatari M, Iida M, Tanimoto M, Kodera Y, Anthony M. Ford, Saito H: Protein expression and constitutive phosphorylation of hematopoietic transcription factors PU. 1 and C/EBP β in acute myeloid leukemia blasts. *International Journal of Hematology.*, 71: 153-158, 2000

3) Miyamura K, Hamaguchi M, Taji H, Kanie T, Kohno A, Tanimoto M, Saito H, Kojima S, Matsuyama T, Kitaori K, Nagafuji K, Sato T and Kodera Y : Successful ribavirin therapy for severe adenovirus hemorrhagic cystitis after allogeneic marrow transplant from close HLA donors rather than distant donors. *Bone Marrow Transplantation.*, 25: 545-548, 2000

4) Motegi M, Yonezumi M, Suzuki H, Suzuki R, Hosokawa Y, Hosaka S, Kodera Y, Morishima Y, Nakamura S, and Seto M: AP12-MALT1 chimeric tInvolved in mucosa-associated lymphoid tissue type lymphoma predict heterogeneous products. *American Journal of*

- Pathology, 156(3): 807–812, 2000
- 5) Yano K, Kanie T, Okamoto S, Kojima H, Yoshida T, Maruta A, Dohi H, Morishita Y, Ozawa K, Sao H, Sakamak H, Hiraoka A, Imoto S, Morishita Y, Kodera Y: Quality of life in adult patients after stem cell transplantation. *International Journal of Hematology.*, 71: 283–289, 2000
- 6) Kato S, Nishihira H, Hara H, Kato K, Takahashi T, Sato N, Kodera Y, Saito H, Sato H and Takanashi M for the Japan Cord Blood Bank Network: Cord blood transplantation and cord blood bank in Japan. *Bone Marrow Transplantation.*, 25:S68–S70, 2000
- 7) Naoe T, Takeyama K, Yokozawa T, Kiyoi H, Seto M, Uike N, Ino T, Utsunomiya A, Maruta A, Jin-nai I, Kamada N, Kubota Y, Nakamura H, Shimazaki C, Horiike S, Kodera Y, Saito H, Ueda R, Joseph Wiemels, and Ohno R: Analysis of Genetic polymorphism in NQ01, GST-M1, GST-T1, and CYP3A4 in 469 Japanese patients with therapy-related leukemia/myelodysplastic syndrome and de novo acute myeloid leukemia¹. *Clinical Cancer Research.*, 6:4091–4095, 2000
- 8) Shiobara S, Nakao S, Ueda M, Yamazaki H, Takahashi S, Asano S, Yabe H, Kato S, Imoto S, Maruta A, Yoshida T, Gondo H, Morishita Y and Kodera Y: Donor leukocyte infusion for Japanese patients with relapsed leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: lower incidence of acute graft-versus-host disease and improved outcome. *Bone Marrow Transplantation.*, 26: 769–774, 2000
- 9) Yamada H, Murakami T, Kaneda T, Tadachi M, Utsumi M, Minami S, Hamaguchi M, Kasai M, Kodera Y, Ohashi H, Morishita Y, Terasawa T, Yamasaki Y, Kamiya Y, Hattori M, Yamanaka K, Tsushita K and Shimoyama M: Clinical significance of major and minor bcr/abl chimeric transcripts in essential thrombocythemia. *Jpn J Clin Oncol.*, 30(11):472–477, 2000
- 10) Kato S, Yabe H, Yasui M, Kawa K, Yoshida T, Watanabe A, Osugi Y, Horibe K and Kodera Y: Allogeneic hematopoietic transplantation of CD34⁺ selected cells from an HLA haplo-identical related donor. A long-term follow-up of 135 Patients and a comparison of stem cell source between the bone marrow and the peripheral blood. *Bone Marrow Transplantation.*, 26:1281–1290, 2000
- 11) Murata M, Emi N, Hirabayashi N, Hamaguchi M, Goto S, Wakita A, Tanimoto M, Saito H, Kodera Y, Morishita Y, for the Nagoya Blood and Marrow Transplantation Group: No Significant Association between HA-1 Incompatibility and Incidence of acute graft-versus-host disease after HLA-Identical sibling bone marrow transplantation in Japanese patients. *International Journal of Hematology.*, 72:371–375, 2000
- 12) Kawano C, Muroi K, Akioka T, Izumi T, Kodera Y and Ozawa K: Cytomegalovirus pneumonitis, activated prothrombin time prolongation and subacute thyroiditis after unrelated allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation.*, 26: 1347–1349, 2000
- 13) Kudo K, Nagai H, Numata S, Ichihara M, Kinoshita T, Horibe K, Kato K, Matsuyama T,

Kodera Y and Kojima S: Absence of mutations in the granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF) receptor gene in patients with myelodysplastic syndrome / acute myeloblastic leukemia occurring after treatment of aplastic anaemia with G-CSF. British Journal of Haematology., 111 : 656-658. 2000

2. 学会発表 :

- 1) 寺倉精太郎 今釜静香 熱田由子 西田徹也 笠井雅信 濱口雅信 小寺良尚: DLI が有効であった非血縁者間同種骨髄移植後 EBV-LPD の2例 第62回日本血液学会総会 福岡 2000.3
- 2) 西田徹也 熱田由子 寺倉精太郎 笠井雅信 小寺良尚 平林紀男 橋詰良夫: 同種骨髄移植後 FK 脳症の臨床と病理 第62回日本血液学会総会 福岡 2000.3
- 3) 熱田由子 今釜静香 寺倉精太郎 西田徹也 笠井雅信 小寺良尚: Ph1 陽性 ALL に対する同種骨髄移植の治療成績 第62回日本血液学会総会 福岡 2000.3
- 4) 森島泰雄 小寺良尚: 非血縁者間骨髄移植における組織適合性抗原の重要性 第62回日本血液学会総会 (シンポジウム) 福岡 2000.3
- 5) Kodera Y: Countries :Country report, The seventh Congress of Asia Pacific Bone Marrow Transplantation Group. Bangkok, Thailand., 2000.11
- 6) 熱田由子 寺倉精太郎 西田徹也 笠井雅信 小寺良尚: 骨髄移植後急性 GVHD に対するステロイド療法の比較検討 第42回日本臨床血液学会総会 倉敷 2000.11
- 7) 寺倉精太郎 西田徹也 熱田由子 笠井雅信 小寺良尚 安藤浩一: 同種造血幹細胞移植後強皮症様症状を発症した4例 第42回日本臨床血液学会総会 倉敷 2000.11
- 8) 小寺良尚: 同種末梢血幹細胞移植 第42回日本臨床血液学会総会 (教育講演) 倉敷 2000.11
- 9) 笠井雅信: Allo-PBSCT ドナー長期安全性についての全国調査 第23回造血細胞移植学会総会 京都 2000.12
- 10) 蟹江匡治 安部明弘 恵美宣彦 久野由恵 谷本光音 斎藤英彦 笠井雅信 河野彰夫 飯田浩光 小寺良尚: SEREX 法を用いた同種造血幹細胞移植後の患者血清中の抗体が認識する抗原の同定 第23回造血細胞移植学会総会 京都 2000.12
- 11) 寺倉精太郎 大庭拓 熱田由子 西田徹也 笠井雅信 濱口元洋 小寺良尚: 非血縁者間同種骨髄移植後に Pure Red-cell Aplasia を合併した1例 第23回造血細胞移植学会総会 京都 2000.12
- 12) 熱田由子 大庭拓 寺倉精太郎 西田徹也 笠井雅信 濱口元洋 小寺良尚: 単一施設における血縁者間同種末梢血幹細胞移植の治療成績 第23回造血細胞移植学会総会 京都 2000.12
- 13) 高塚祥芝 宇都宮興 大渡五月 竹内昇吾 牧野虎彦 魚住公治 屋敷伸治 園田俊朗 熱田由子 小寺良尚: 同種骨髄移植を施行した ATL 3例 第23回造血細胞移植学会総会 京都 2000.12

G. 知的所有権の取得状況：

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

表-1

1. EBV-LPDに対する非血縁ドナーからのDLT2例
—細胞治療の初期モデルとして—

DLTは同種骨髄移植後の再発白血病やEBV-LPDに対し再び治癒を望み得る治療法として今年度より健康保険適用医療となった。DLTは骨髄ドナー末梢血中のリンパ球分画を未操作で輸注するという、細胞を用いた治療の最もprimitiveな形のものであるが、それだけに体外操作する際に問題となる様々な規準の枠外にあり、現実的且つcost-benefitの高い治療法になるものと考えられる。ここでは200cc前後の全血提供で済むことから、非血縁ドナーからも同意の得られやすい、EBV-LPDに対するDLTを細胞治療の初期モデルとして位置づけ、その可能性と限界につき検討する。

表-2

骨髄移植

24歳 女性

疾患:再生不良性貧血

ドナー:HLA-DRB1一座不一致非血縁者

前処置:CY(50mg/kg/day × 4days)

ATG(2.5mg/kg/day × 4days)

TLI 5Gy、TBI 5Gy

GVHD予防:短期MTX+FK506

表-3

移植後経過

血液学的回復は順調で、急性GVHDは生じなかった。
 Day39より、39~40°Cの高熱、頸部リンパ節腫脹、扁桃腫大が生じ、末梢血中に異型リンパ球が出現するようになった。
 Day42に頸部リンパ節生検を施行し、EBV-LPDと診断した。
 FK506の減量を開始したが、高熱は持続し頸部リンパ節腫脹も増悪した。
 Day49にDLI(CD3 $0.82 \times 10^6/\text{kg}$)を施行した。その後、リンパ節腫大は縮小し、LDHも改善した。しかし、38°C前後の発熱が持続し、LDHが再び上昇したため、Day68に2回目のDLI(CD3 $1.04 \times 10^6/\text{kg}$)を行い、解熱とLDHの改善を認めた。
 Day100頃から顔面に掻痒感を伴う紅色小丘疹が出現し、体幹および四肢に拡大した。皮膚生検にて、GVHDと診断し、m-PSL125mg/dayを投与し改善した。その後EBV-LPDの再発はなく、移植後824日までにCyAはoffとしたが慢性GVHDも再燃しておらず良好な経過を取っている。

図-1

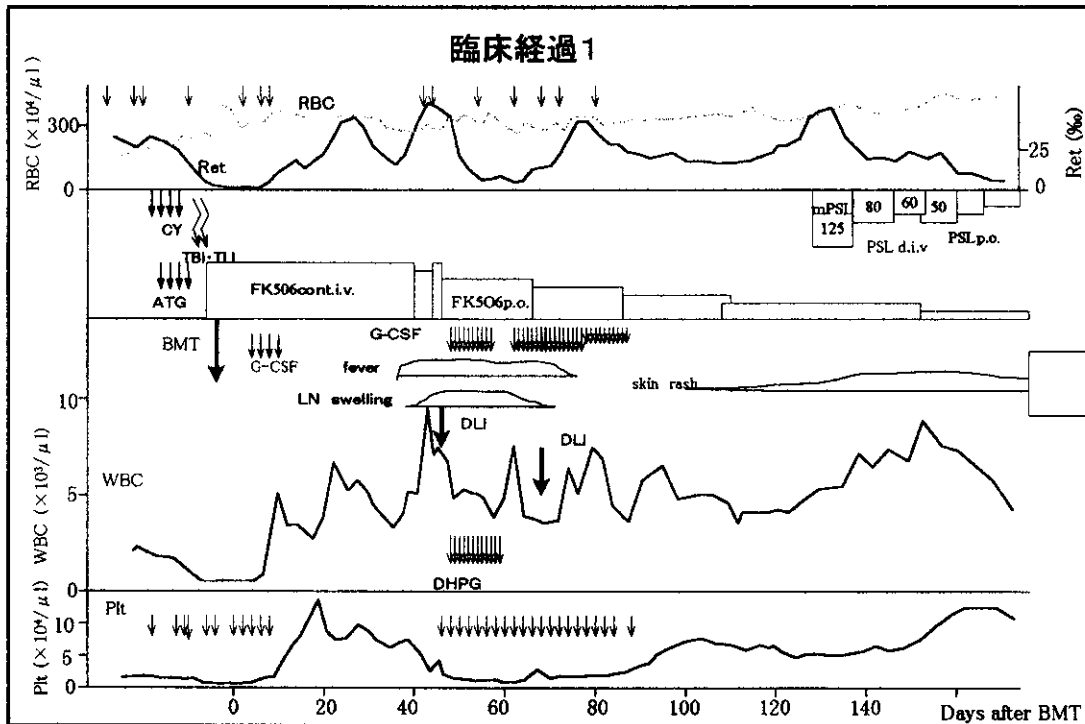


表-4

骨髓移植

19歳 男性

疾患:再生不良性貧血

ドナー:HLA-A B DR遺伝子型レベル一致
非血縁者

前処置:CY(50mg/kg/day × 4days)

ATG(2.5mg/kg/day × 4days)

TLI 5Gy、TBI 5Gy

GVHD予防:短期MTX+CyA

表-5

移植後経過

血液学的回復は順調で、急性GVHDは生じなかった。Day26より、39~40℃の高熱を発するようになった。この時点では臨床症状は乏しかった。EBV-LPDを疑ってCyAの血中濃度をトラフで100前後にコントロールしたが高熱は持続し、day39頃より徐々に頸部リンパ節腫脹、LDH上昇、末梢血中に異型リンパ球が出現するようになった。Day42に頸部リンパ節生検を施行し、EBV-LPDと診断した。(図2) Day45にDLI(CD3 3.3×10^6 /kg)施行した。その後、リンパ節腫大は徐々に縮小したが、38℃前後の発熱が持続したため、day58に2回目のDLI(CD3 1.3×10^6 /kg)を行った。このころ同時に全身に微細な赤色丘疹が出現し病理学的にはGVHDは否定的であるため経過を見ていたところ、胸部CT上 両肺に微細な間質陰影を認め、低酸素を来したため臨床的に慢性GVHD・間質性肺炎と考えm-PSL125mg/dayを投与し改善した。のちに皮疹は病理学的に慢性GVHDと診断された。m-PSL投与にてEBV-LPDは再発を認めなかった。

図-2

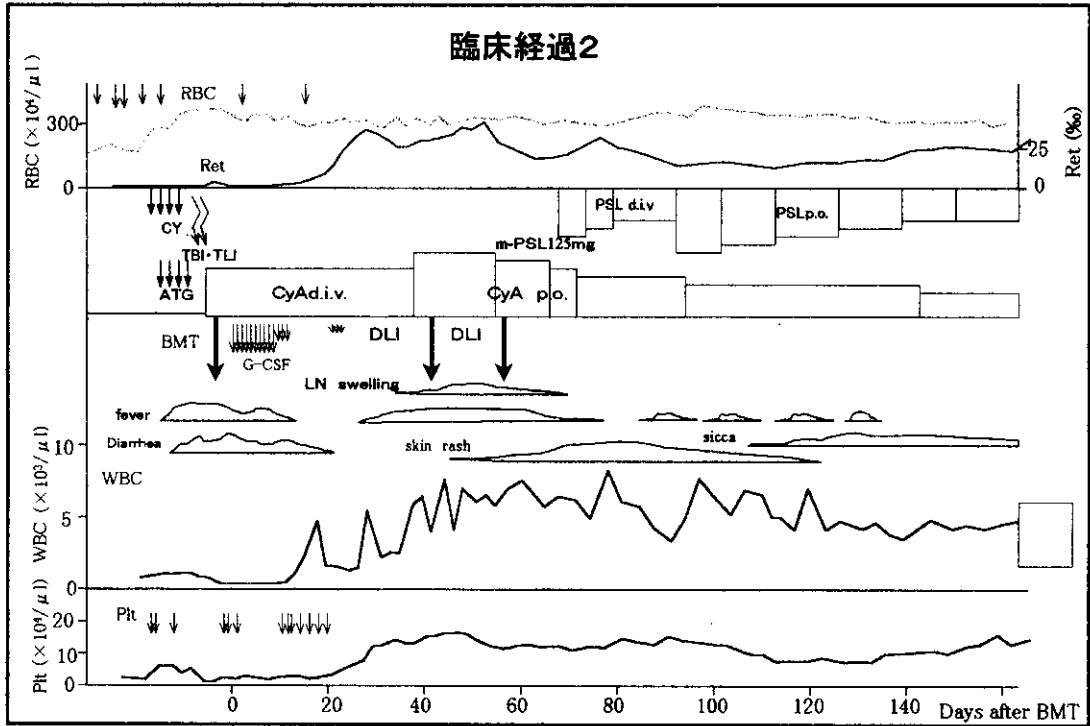


図-3

