

A. 研究目的

ドナーリンパ球輸注療法(DLI)は慢性骨髄性白血病の慢性期に対しては有効性が証明され、わが国においてもすでに保険適応にもなっているが、その一方で、致死的GVHDが7%前後出現していることやフェレーシスによって大量のリンパ球の採取が必要なため、ドナーの負担が大きいこと、急性白血病に対しては、ほとんど無効であることなどの問題点が明らかになってきた。これらの問題点を解決するために開発した方法が活性化ドナーCD4輸注療法である。これは、ドナー末梢血を10-20ml採血し、CD4陽性細胞に分離した後、固相化CD3抗体とIL-2で活性化することにより、DLIに必要なT cellを約1000倍増幅して輸注する方法である。活性化したCD4陽性細胞を輸注することにより、GVL効果と効果発現までの期間を短縮する狙いがあるとともに、GVHDを軽減させることを目的としている。我々は平成12年度から小寺班において、血縁者においてこの治療を行い、56例の症例を集積してきた。その結果、重症GVHDの頻度は従来法と比較して約半数の頻度にとどまり、従来法ではほとんど無効であった急性白血病においても約1/3の例で完全寛解を得た。本年度はこの preliminary な臨床研究

の結果を受け、新GCPに則ったプロトコルの作成とGTP(Good Tissue Practice)に準拠した細胞治療製剤の製造の基盤整備を目的とした。

また今年度はアデノウイルス、薬剤耐性サイトメガロウイルスなど移植後免疫不全に伴う重篤なウイルス感染症や移植後拒絶、生着不全に対しての活性化CD4輸注療法の適応拡大に向けた基礎的検討を開始し、臨床研究に向けた取り組みを行なった。

B. 研究方法

1. 移植後再発白血病に対する活性化ドナーCD4陽性細胞輸注療法
移植後再発白血病に対しての活性化CD4輸注療法の効果と安全性を確認するため、これまで行なってきた症例に対し後方視的に調査を行なった。
2. GTPに準拠した細胞治療製剤(活性化CD4陽性細胞)のcell processingに向けた基盤整備
臨床試験に先立ちGTPに準拠して安全に細胞を作成するためのCPCの整備を行なった。また、活性化CD4陽性細胞の安全性、規格を決定するために3基準書、1標準書(製造衛生管理基準書、製造管理基準書、品質管理基準書、製品標準書)を作成し、その成果としてISO 9001の認証取得を目指した。

3. 活性化 CD4 輸注細胞の適応拡大に向けた取り組み

3-1 移植後免疫不全における難治性ウイルス感染症に対する活性化 CD4 輸注療法

これまでに施行した移植後難治性ウイルス感染症に対する活性化リンパ球療法の効果と安全性を確認するため、アンケート調査を実施した。効果判定は CMV, Adeno virus に関しては、ウイルス学的に抗原あるいはウイルスゲノムの消失を基準とし、臨床症状の改善を加えて判定した。

3-2 移植後拒絶、生着不全に対する活性化 CD4 輸注療法の基礎的、臨床的検討

これまで施行した移植後拒絶、および生着不全例に対する活性化 CD4 輸注例を後方視的に解析し、免疫不全マウスを用いてヒト臍帯血移植後拒絶モデルを作成し、実際の活性化 CD4 陽性細胞による生着促進効果を in vivo の系を用いて解析した。

C. 研究結果

1. 移植後再発白血病に対する活性化ドナーCD4 陽性細胞輸注療法

	ANLL	ALL	CML
No. of patient	11	14	3
Male/Female	4/7	6/8	2/1
Median age	10Y (4-15)	7Y (1-30)	19Y (13-47)
Stage at DLI	MRD ^{*1} 2 Overt 9	MRD 2 Overt 10 Ex medullar ^{**} 2	CP ^{***} 0 AP ^{***} 2 BC ^{***} 1
HLA	7/8	8	2
6/8	0	2	0
5/8	2	2	1
4/8	2	2	0
3/8			

Table 1 対象患者
^{*1} MRD: Minimal residual disease ^{*4} AP: Accelerated phase
^{*2} Ex medullar: extra medullar relapse ^{*5} BC: Blastic crisis
^{*3} CP: Chronic phase

Table 1 に治療対象患者を示した。対象疾患は急性白血病と慢性骨髄性白血病の加速期以降の患者でいずれも通常の DLI での治療効果が見込めない患者を対象とした。HLA の一致度は完全一致が 17 例/28 例、ミスマッチ例が 11 例/28 例であった。

	CR (blast <5%)	PR (blast 10% 以上の減少)	寛解までの期間 (中央値)
ANLL	4/11 (36%)	1/11 (9%)	6W (3-15)
ALL	5/14 (36%)	1/14 (7%)	2.5W (2-3)
CML	1/3 (33%)	0/3	47W

Table 2 AT-CD4-DLIの臨床効果

臨床効果としては、完全寛解率は ANLL36%, ALL 36%, CML 33%であった。寛解までの期間の中央値は ANLL で6週、ALL で2.5週、CML は47週を要した。

発熱	1/28	(3.6%)
頭痛	1/28	(3.6%)
血小板減少症 (Plt<20,000)	4/28	(14.3%)
好中球減少症 (Neutro<500)	3/28	(10.7%)
腹水	1/28	(3.6%)
心膜炎	1/28	(3.6%)
TMA*	1/28	(3.6%)
BO**	1/28	(3.6%)
Acute GVHD		
None	19/28	(67.9%)
Grade I	2/28	(7.1%)
Grade II	2/28	(7.1%)
Grade III	4/28	(14.3%)
Grade IV	1/28	(3.6%)
Chronic GVHD		
None	22/27	(81.5%)
Limited	2/27	(7.4%)
Extensive	3/27	(11.1%)

Table 3 AT-CD4-DLIの副作用
* TMA: Thrombotic microangiopathy ** BO: Bronchiolitis obliterans

副作用においては III 度以上の GVHD は 17.9%に認められたが、GVHD が全く認められないか I 度のものは 75%で軽度であった。また、GVHD の重症度と HLA の disparity の間に相関は認めず、同様に GVL 効果とも相関は認めなかった。この他の副作用として腹水、心膜炎、TMA の悪化、BO が 1 例ずつ認められた。

2.GTP に準拠した細胞治療製剤（活性化 CD4 陽性細胞）の cell processing に向けた基盤整備

GTP に則り安全に活性化 CD4 陽性細胞製剤の cell processing を行なうために東京医科歯科大学、神戸先端医療センターに CPC を整備した。先行する移植後難治性ウイルス感染症に対する活性化 CD4 輸注療法の臨床研究を行なうために、東京医科歯科大学細胞治療センターでは、株式会社リンフォテックの協力を得て活性化リンパ球の培養手順、品質管理基準、製造管理基準、衛生管理基準を含めたすべての作業の明確化と文書化、および記録書とその管理基準の作成を行なった。一方、細胞治療・再生医療では生きた状態の生体材料の取り扱いが必須であるが、生体には持続・潜伏感染する病原体が多数存在するため、出発材料の段階で無菌性を保証することは不可能である。したがって、細胞製剤の安

全性を確保するためには、最終製品の全数検査を行う必要があり、実用化に耐える高感度・迅速・安価な検査システムの開発が不可欠である。我々は、すべての要求を満たす新たなウイルス検査系の開発も併せて行ない、基本的な検査システムの構築を終了した。構築した安全管理体制の客観的な評価を受けるため、東京医科歯科大学細胞治療センターでは国際的な品質マネジメントシステム ISO9001 認証を取得した。

3.活性化 CD4 輸注細胞の適応拡大に向けた取り組み

3-1 移植後免疫不全における難治性ウイルス感染症に対する活性化 CD4 輸注療法

Effect of Donor CD4 T Cell Transfusion for Opportunistic Infection after SCT

Infection	Cases	Effective
CMV infection	16	7/10
Adenovirus infection	4	4/4
RSV infection	2	0/2
Coxsackie virus infection	1	1/1
Measles	1	1/1
H. Simplex	1	1/1
HHV6	4	0/4
Others		
Total	30	15/24

Table 4

これまでに移植後免疫不全状態における難治性ウイルス感染症に対する活性化リンパ球輸注療法の治療結果

を Table 4 に示した。CMV, Adeno virus 感染症に関しては、ウイルス学的検査、臨床効果とも改善が認められ有効と考えられた。GVHD は I 度 1 例, II 度 2 例の急性 GVHD が認められたが、III 度以上の重症 GVHD は出現しなかった。しかし、2 例に SIRS が認められ、全身感染症を有する場合の投与には注意すべき副作用であると考えられた。この 2 例については、mPSL pulse 療法にて改善している。有効性が確認された CMV 感染症および Adeno virus 感染症に対して臨床研究を計画している。

3-2 移植後拒絶、生着不全に対する活性化 CD4 輸注療法の基礎的、臨床的検討

本研究班で移植後生着不全・拒絶に対する活性化 CD4 輸注の治療成績を Table 5 に示した。

移植後生着不全・拒絶に対する CD4 ⁺ DLI		
	No of patient	Clinical effect
Rejection	4	2/4 (50%)
complete rejection	2	2/2 (100%)
Aplastic anemia	1	
LCH	1	
mix chimeras	2	0/2 (0%)
Aplastic anemia	2	
Graft failure	2	0/2 (0%)
MDS(JMML)	1	
ALL	1	

Table 5

内訳は早期拒絶に対して 2 例、晩期の mix chimera の complete chimera 誘導目的が 2 例、生着不全に対して 2 例行っ

た。臨床効果は早期拒絶の 2 例は 2 例ともドナータイプの造血の回復を認めたが、生着不全例、mix chimera 例に関しては、無効であった。

我々は NOD/SCID マウスのヒト臍帯血移植後拒絶モデルを作成し、in vivo での活性化 CD4 陽性細胞の骨髄細胞生着促進効果を確認した。

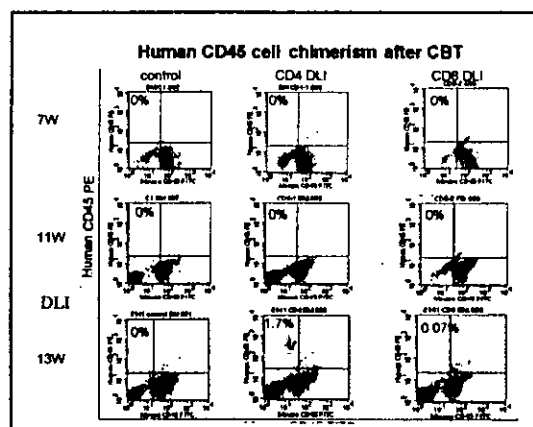


Fig 1

活性化 CD4 陽性細胞輸注群では 2/2 例の拒絶マウスでの再生着を認めたのに対し、活性化 CD8 陽性細胞群では 1/2 で短期間のみの一時的再生着を認めたが、再び拒絶された。また、CD4 群では輸注後の副作用は認められなかったが、CD8 群では、マウスの脱毛、著明な体重減少が認め、GVHD と考えられた。

D. 考察

これまでに行なった活性化 CD4 陽性細胞輸注療法の臨床研究において GVHD は軽度であり、HLA ミスマッチ例に対しても DLI を行なえる可能

性が示された。また、適応拡大として移植後難治性ウイルス感染症や移植後拒絶に関して効果があることが、示唆された。

E. 結論

これまでの研究により、次世代型 DLI としての活性化 CD4 陽性細胞の安全性は示されたと考えられる。また、培養の安定化、品質管理、GTP にできる限り準拠した培養法の確立という目的をクリアし、臨床試験の準備は整った。また移植後再発白血病の治療にとどまらず、移植後免疫不全に対する難治性ウイルス感染症、移植後拒絶に効果がある可能性があり、臨床研究を準備している。

F. 健康危険情報

特記すべきことはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. The pilot experience of immunotherapy-combined photodynamic therapy for advanced gastric cancer in elderly patients. H. Yanai, Y. Kuroiwa, **N. Shimizu**, Y. Matsubara, T. Okita and T. Sekine. *Int. J. Gastrointest. Cancer*, 32: 25-28, 2003.

2. Nagasawa M. Itoh S. Sawada Y. Morio T. Nonoyama S. Mizutani S.

Coagulopathy in a patient with X-linked hyper-IgM syndrome who developed

Kaposi's sarcoma. *Am. J. Hematol.* 75:116-117, 2004.

3. Imai K, Morio T, Zhu Y, Jin Y, Itoh S, Kajiwara M, Yata JI, Mizutani S,

Ochs HD, Nonoyama S. Clinical course of patients with WASP gene mutations.

Blood. 10:456-64, 2004.

4. EBウイルス 監修：高田賢蔵、編集：柳井秀雄、**清水則夫**、診断と治療社、2003 「DNA 診断法」および「EBV 特異的細胞障害性 T 細胞による EBV 関連疾患に対する養子免疫療法」

5. 伊藤 仁也 活性化リンパ球輸注療法: 今日の移植 17(1)P89-98, 2004

6. 伊藤 仁也、中畑 龍俊、臍帯血造血幹細胞の ex vivo 増幅:細胞 36(2), P48-51, 2004

7. 伊藤 仁也 培養 CD4 陽性 T 細胞による再発白血病の治療

分子細胞治療 1(3) P307-313, 2002

学会発表

1. Morio T. Molecular Basis of Primary Immunodeficiency. The 46th Meeting of Korean Association of Immunobiologists. April 19, 2003, Seoul.
2. Morio T. Activated T-Cell Transfusion for Opportunistic Infection in Immunodeficient Patients. Nihon University School of Medicine Symposium "Cell Biology of Virus Infection", October 14, 2003, Tokyo.
3. Morio T. Activated T-Cell Transfusion for Opportunistic Infection in Immunodeficient Patients and for Post-transplant Infections. The 2nd International Symposium "New Challenges in the Post Genome Era 2003", November 13, 2003, Seoul.
4. Morio T. Activated T-Cell Transfusion for Opportunistic Infection in Immunodeficient Patients and for Post-transplant Infections. The 10th Meeting of Transplantation/Immunoregulation 21, November 15, 2003, Tokyo.
5. 森尾友宏、清水則夫：活性化 T 細胞の培養・保存法と品質管理、「細胞処理および保存法」、第 51 回日本輸血学会総会シンポジウム、小倉、2003 年
6. 網羅的ウイルス検出システムの開発 清水則夫、渡辺 健、渡辺 哲、山本興太郎、森尾友宏、馬場憲三 第 18 回ヘルペスウイルス研究会、2003 年 6 月、小豆島
7. 再生医療・細胞治療の製品保証に関する研究：多項目迅速ウイルス検査システムの開発 清水則夫、渡辺 健、渡辺 哲、山本興太郎、森尾友宏、水上美樹、馬場憲三 2003 年 10 月、京都市
8. 活性化 CD4 輸注療法の適応と選択 伊藤 仁也 第 51 回輸血学会シンポジウム 小倉、2003 年
9. 移植後再発急性白血病に対する活性化ドナー CD4 陽性細胞輸注療法の治療成績 伊藤 仁也、森尾 友宏、清水 則夫、小寺 良尚、関根 暉彬 第 65 回日本血液学会・第 45 回日本臨

床血液学会ワークショップ 大阪市
2003

H. 特許

1. 標的核酸の検出法 特願 2003 - 164799
2. アロジェニックな活性化CD4陽性細胞を主成分とする製剤ならびにその製剤の製造方法特許出願番号 特願平 10-97378
3. 臍帯血由来活性化リンパ球及び該リンパ球を主成分とする製剤ならびに該製剤の製造方法、該製剤調製用キット 特開 2002 - 171966

米国出願していた上記特許 (CORD BLOOD-DERIVED ACTIVATED LYMPHOCYTES, PREPARATIONS CONTAINING SAID LYMPHOCYTES AS MAIN INGREDIENT AND METHOD AND KIT FOR PRODUCING SAID PREPARATIONS.) が 2004年2月17日付けで成立し、特許証が発行された。特許番号 US6,692,958

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

マイナー抗原特異的 T 細胞による DLI のための臨床試験体制の
確立と実施に関する研究

分担研究者 赤塚美樹（愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部）

研究要旨

マイナー抗原は同種移植において、ドナーと患者間における遺伝子多型の違いによって移植片対宿主病（GVHD）や移植片対白血病／リンパ腫（GVL）効果の標的となる抗原である。我々が同定した血液系細胞に特異的に発現する遺伝子 *BCL2A1* にコードされる HLA-A24 および HLA-B44 拘束性のエピトープは、移植後の造血器腫瘍に対する T 細胞療法に有用と予測された。HLA-A24 拘束性のエピトープの不適合が移植に及ぼす影響を統計学的に解析したところ、その不適合は重症 GVHD の発症に寄与していなかった。一方、不適合が存在するだけでは、移植後の再発を有意に抑える効果も認められなかったため、このマイナー抗原に特異的な細胞傷害性 T リンパ球（CTL）を体外で増幅し患者に輸注することで、GVHD のリスクを回避しながら、GVL 効果を期待できると考えられる。*BCL2A1* 以外に Y 染色体上の *TMSB4Y* 遺伝子にコードされるマイナー抗原も同定され、その臨床的意義等につき解析を継続している。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植は、造血器腫瘍に対する有用な治療法として確立されてきた。しかし、難治性造血器腫瘍に対する移植成績は満足できるものではない。その大きな原因として移植後の再発が挙げられる。同種移植後にはドナーのリンパ球が患者に残存する腫瘍細胞を傷害する移植片対腫瘍（GVL）効果が期待できるが、その効果が原病の悪性度を克服できないと再発が起ると考えられる。GVL 効果においてドナー由来 T リンパ球の主要な標的となっているものがマイナー抗原である。マイナー抗原はドナー・患者間の遺伝子多型の違いに由来する蛋白断片（ペプチド）が HLA に提示されて抗原性を持ったものである。腫瘍細胞を含む血液系細胞に特異的に発現する遺伝

子にコードされるマイナー抗原は、移植後の再発腫瘍に対する免疫療法に有用である。今回我々は、我々が最近同定した *BCL2A1* 遺伝子上の遺伝子多型部分にコードされるマイナー抗原（ACC-1）の不適合が移植後の成績に及ぼす影響を日本骨髄バンク（JMDP）を介して行なわれた非血縁者間骨髄移植症例を対象に解析を行なった。また、HLA-A33 によって提示される新規のマイナー抗原を同定したので報告する。

B. 研究方法

① ACC-1 特異的細胞傷害性 T リンパ球（CTL）クローンを樹立した患者の移植後末梢血中の ACC-1 特異的 CTL の存在及び体外での増幅能について HLA-A24 分子に ACC-1 ペプチドを組み込んだテトラマーを用いて

検討した。

② 1993年1月より1998年4月までの間に JMDP において移植を受け、かつ本研究班の研究者によって HLA-A, B, C, DR, DQ が DNA レベルで一致していると確認された症例のうち、原疾患が造血器腫瘍であり、サイクロスポリン A が移植後の免疫抑制剤として投与された HLA-A24 陽性の 320 例を対象とした。なお、本研究は愛知県がんセンターの遺伝子倫理審査委員会の承認（許可番号：13 愛がん第 11-4 号）を受け、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）を遵守して施行されたものである。症例の内訳を表 1 に示した。

③ 女性ドナーより CML に対して HLA 一致同胞間移植を受けた男性患者より、CTL クローンを樹立した。クローンの特異性はさまざまな細胞からなるパネルを用いて行った。Y 染色体上にコードされるマイナー抗原を認識していると判明したため、Y 染色体部分欠損株を用いた検討により、遺伝子の局在を決定した。遺伝子の各種組織での発現は TaqMan PCR 法を用いて行った。

C. 研究結果

① 患者移植後末梢血中に少なくとも 7 ヶ月間はテトラマーで検出できる ACC-1 に特異的な CD8 陽性細胞が存在し（図 1A）、試験管内で ACC-1 ペプチドにて刺激することによりその割合を劇的に増加することが出来た（図 1B）。また検体中の移植後 43 日目の末梢血中のテトラマー陽性 T リンパ球の絶対数は 40 個であったが、2 週間の刺激で約 10 万倍に増やすことが出来た（図 1C）。さらに試験管内で増幅した T 細胞株は患者の B リンパ球細胞株を傷害できたため、体

外で増幅した T リンパ球は細胞傷害能を保持していることが分かった（図 1D）。

② ドナー・患者間で ACC-1 の移植片対宿主病（GVHD）または GVL 方向の不適合が 2 度以上の重症急性 GVHD の発症に与える影響を、ACC-1 適合群と不適合群の 2 群に分けて多変量解析した（表 2）。ACC-1 の GVHD 方向不適合は重症 GVHD の発症に影響を与えなかった。また白血病の再発にも影響はなかった。

③ 女性ドナーより移植を受けた男性患者より樹立した CTL クローンは造血系細胞を強く傷害し、非造血組織由来の細胞に対する傷害は軽度か無かった。B-LCL パネルを用いた検討により、クローンは HLA-A33 拘束性であり、男性由来の細胞のみを傷害することが判明した。Y 染色体部分欠損 B-LCL パネルを用いた検討により、マイナー抗原をコードする遺伝子は Yq11.2 領域に存在する *TMSB4Y* であることが判明した（図 2）。また該当 cDNA の deletion mutant、minigene を用いた実験等により、エピトープは 11mer のアミノ酸からなるペプチドと判明した。この遺伝子は定量 PCR により、比較的造血系細胞に強く発現するが、昨年度報告した ACC-1 をコードする *BCL2A1* 遺伝子のように造血系細胞に限局した発現パターンは認められなかった（図 3）。現在、造血器腫瘍に対する免疫療法に応用可能かを検討している。

D. 考察

統計学的解析によりドナー・患者間における ACC-1 の不適合は重症 GVHD の発症に寄与しないことが分かった。ただ今回の解析は対象が遺伝的バックグラウンドの多様な非血縁者間移植を対象としており、今後同胞間の症例における解析が必要と思われる

る。また ACC-1 の不適合は再発予防効果にも寄与しなかった。しかし、テトラマー解析の結果より、ACC-1 特異的 CTL は患者の末梢血中に存在しており、適当な抗原刺激により増幅が可能であったことより、体外で増幅して白血病再発時に養子免疫療法の形で臨床応用が可能と思われる。既に本 ACC-1 を用いた養子免疫療法の臨床試験プロトコルは愛知県がんセンターの倫理委員会承認されており、現在症例の登録を行っている。

HLA-A33 によって提示される Y 染色体上の新規マイナー抗原は、組織発現パターンが ACC-1 (BCL2A1) ほど血液性細胞に特異的ではないが、比較的血液系細胞に多く発現しており、造血器腫瘍の免疫療法に応用できる可能性が十分ある。実際患者は移植後に急性 GVHD を発症していない。現在、テトラマーを使って患者末梢血中での動態等の解析を行っている。

E. 結論

同種造血幹細胞移植におけるマイナー抗原 ACC-1 の不適合の意義を検討したところ、GVHD、再発の何れにも有意な影響を与えなかったが、養子免疫療法として積極的に移植後再発白血病の治療に使える可能性が示された。また HLA-A33 拘束性のマイナー抗原については、今後の臨床応用について検討する意義があると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Akatsuka Y, Nishida T, Kondo E, Miyazaki M, Taji H, Iida H, Tsujimura K, Yazaki M,

Naoe T, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. Identification of a polymorphic gene, BCL2A1, encoding two novel hematopoietic lineage-specific minor histocompatibility antigens. *J Exp Med.* 2003;197:1489-1500.

2) Miyazaki M, Akatsuka Y, Nishida T, Fujii N, Hiraki A, Ikeda K, Tsujimura K, Kuzushima K, Morishima Y, Sato S, Ueda R, Takahashi T. Potential limitations in using minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells for targeting solid tumor cells. *Clin Immunol.* 2003;107:198-201.

3) Topp MS, Riddell SR, Akatsuka Y, Jensen MC, Blattman JN, Greenberg PD. Restoration of CD28 expression in CD28⁻ CD8⁺ memory effector T cells reconstitutes antigen-induced IL-2 production. *J Exp Med.* 2003;198:947-955.

4) Tsujimura K, Obata Y, Kondo E, Nishida K, Matsudaira Y, Akatsuka Y, Kuzushima K, Takahashi T. Thymus leukemia antigen (TL)-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the $\alpha 1/\alpha 2$ domain of TL free from antigenic peptides. *Int Immunol.* 2003; 15:1319-1326.

5) Akatsuka Y, Warren EH, Gooley TA, Brickner AG, Lin MT, Hansen JA, Martin PJ, Madtes DK, Engelhard VH, Takahashi T, Riddell SR. Disparity for a newly identified minor histocompatibility antigen, HA-8, correlates with acute graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation from an HLA-identical sibling. *Br J Haematol.* 2003;123:671-675.

6) Nishida T, Akatsuka Y, Morishima Y, Hamajima N, Tsujimura K, Kuzushima K, Kodera Y, Takahashi T. Clinical relevance of a newly identified HLA-A24-restricted minor

histocompatibility antigen epitope derived from BCL2A1, ACC-1, in patients receiving HLA genotypically matched unrelated bone marrow transplant. *Br J Haematol.* 2004; 124:629-635.

- 7) Kondo E, Akatsuka Y, Kuzushima K, Tsujimura K, Asakura S, Tajima K, Kagami Y, Kodera Y, Tanimoto M, Morishima Y, Takahashi T. Identification of novel CTL epitopes of CMV-pp65 presented by a variety of HLA alleles. *Blood.* 2004;103:630-638.
- 8) Nakajima H, Akatsuka Y. The Fifth Nagoya International Blood And Marrow Transplantation Symposium: unlimited possibilities of hematopoietic cell transplantation: lessons from the past and prospects for the future. *Int J Hematol.* 2004;79:200-204.

2. 学会発表

- 1) 赤塚美樹、西田徹也、高橋利忠：マイナー組織適合抗原を標的とした移植後再発白血病に対する養子免疫療法：第7回基盤的癌免疫研究会シンポジウム 岡山 2003年7月
- 2) 赤塚美樹、近藤英生、田地浩史、森島泰雄、高橋利忠：血液系細胞に特異的なマイナー組織適合抗原を認識するCTLの樹立：第60回日本癌学会総会カッティングエッジフォーラム 名古屋 2003年9

月

- 3) 赤塚美樹、森島泰雄、高橋利忠：マイナー組織適合抗原を標的とした移植後再発白血病に対する養子免疫療法と問題点：第3回トランスレーショナルリサーチワークショップ 淡路 2003年9月
- 4) 赤塚美樹、西田徹也、笹月健彦、猪子英俊、石川善英、十字猛夫、佐治博夫、小寺良尚、高橋利忠、森島泰雄：HLA-A24拘束性・血液系細胞特異的マイナー抗原ACC-1を用いた養子免疫療法に向けての基礎的検討：第26回日本造血細胞移植学会 横浜 2003年12月
- 5) Akatsuka Y, Nishida T, Takahashi T : Identification of a novel HLA-A*2402 restricted minor histocompatibility antigen and its potential therapeutic use : 第23回国際札幌がんセミナー 札幌 2003年7月
- 6) Akatsuka Y : Role of HLA class I and minor HA for unrelated BMT through JMDP : 第5回名古屋国際血液骨髄移植シンポジウム 名古屋 2003年5月
- 7) Akatsuka Y: Identification of two novel minor histocompatibility antigens (mHA) by linkage analysis and their clinical relevance : 2004 IBMTR/ABMTR Tandem BMT Meeting : フロリダ 2004年2月

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1 患者背景

	ACC-1		P-value
	Compatible	Incompatible	
No. of pairs	264	55	
Median patient age, years (range)	25 (1-50)	26 (7-50)	0.40
Median donor age, years (range)	34 (20-50)	33 (21-49)	0.43
Sex (donor/recipient), n (%)			0.99
Male/male	102 (39)	22 (40)	
Male/female	66 (25)	14 (25)	
Female/male	59 (22)	11 (20)	
Female/female	38 (14)	8 (15)	
Disease, n (%)			0.83
Standard risk leukaemia*	118 (45)	22 (40)	
High risk leukaemia†	115 (43)	26 (47)	
Others	32 (12)	7 (13)	
Preconditioning, n (%)			0.86
TBI regimen	224 (85)	47 (86)	
Non-TBI regimen	41 (15)	8 (14)	
GVHD prophylaxis, n (%)			0.27
Cyclosporine based	232 (88)	51 (93)	
Tacrolimus based	33 (12)	4 (7)	

TBI, total body irradiation; GVHD, graft versus host disease.

*Acute leukaemia in first complete remission and chronic myeloid leukaemia in first chronic phase.

†More advanced stage than standard risk leukaemia.

表 2 多變量解析結果

Outcome and factor	Odds/hazard ratio (95% CI)	P-value
Acute GVHD (grades II-IV)		
ACC-1 disparity	0.91 (0.52-1.58)	0.73
Patient age	0.98 (0.97-1.00)	0.04
Chronic GVHD		
ACC-1 disparity	1.01 (0.59-1.73)	0.96
Donor age	1.04 (1.01-1.07)	0.007
Relapse		
ACC-1 disparity	1.04 (0.51-2.14)	0.91
Risk of leukaemia	3.17 (1.78-5.62)	<0.0001
Disease-free survival		
ACC-1 disparity	1.00 (0.65-1.55)	0.99
Risk of leukaemia	2.12 (1.51-3.00)	<0.0001
Patient age	1.02 (1.01-1.03)	0.006
Donor age	1.03 (1.01-1.05)	0.02

GVHD, graft versus host disease; CI, confidence interval.

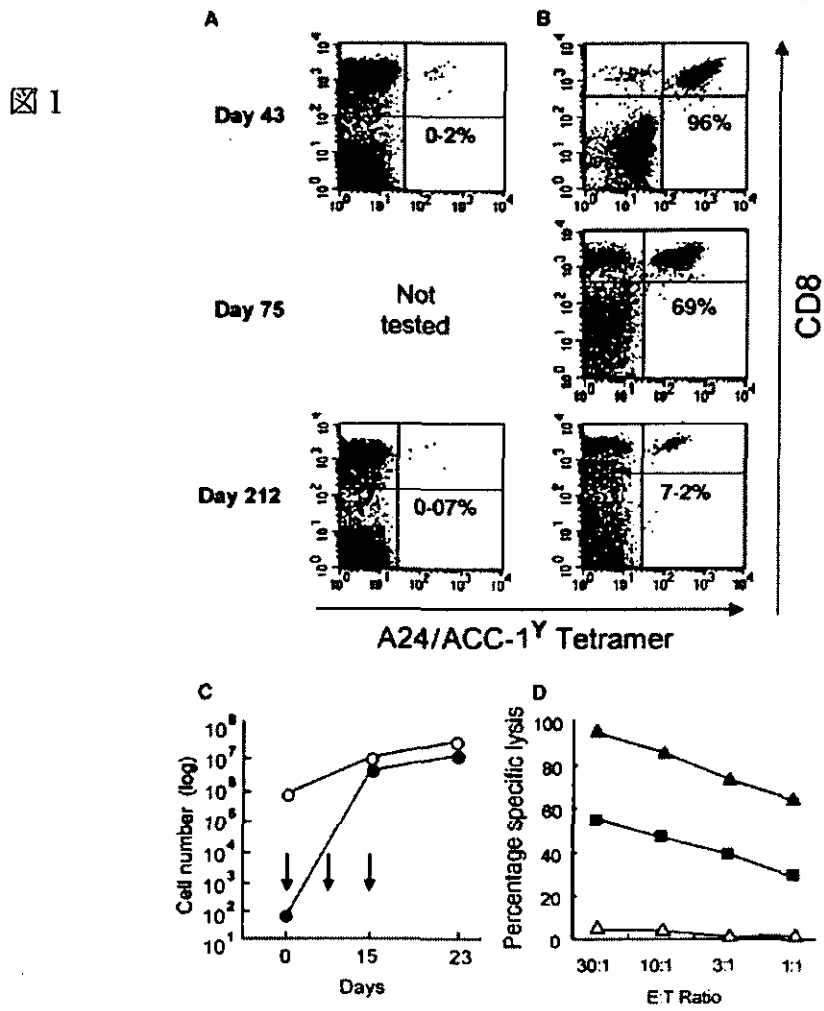


図2 Y染色体 deletion mutants 細胞株を用いたマイナー抗原遺伝子の局在化

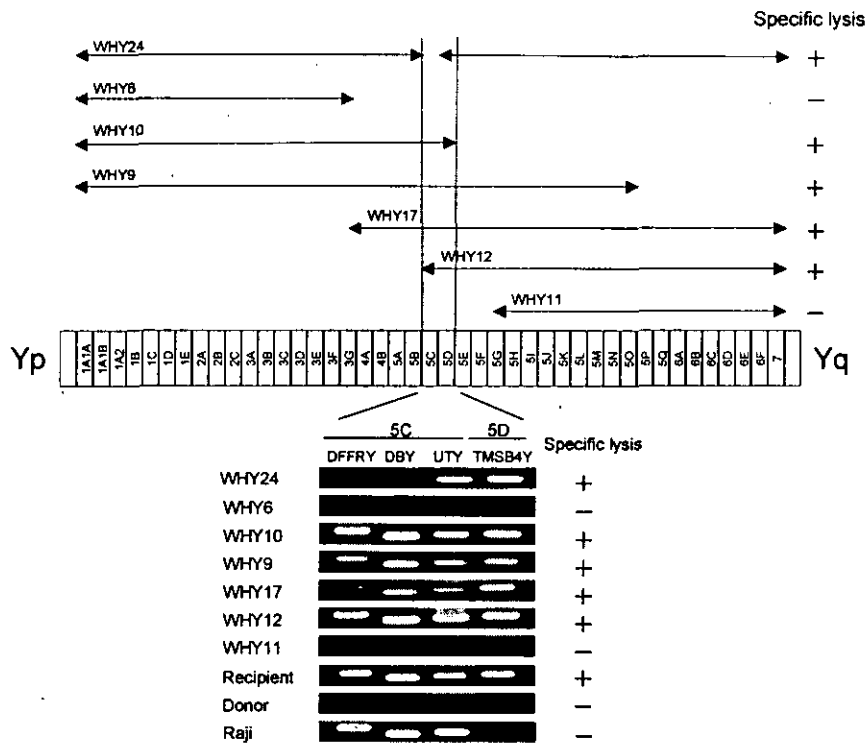
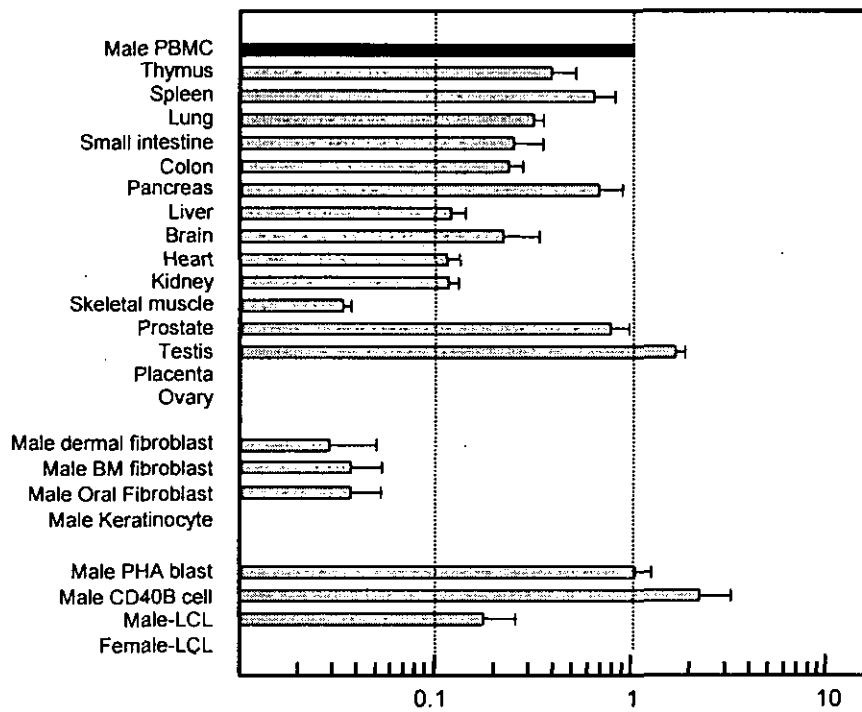


図3 TMSB4Y の組織発現 (TaqMan PCR 法)



MHC テトラマーによる EB ウイルス特異的細胞障害性 T 細胞のモニタリング

分担研究者 小島勢二 名古屋大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 移植前治療として抗ヒト胸腺グロブリン(ATG)の投与を受けた同種骨髄移植患者 15 例において、EB ウイルス(EBV)特異的細胞障害性 T 細胞(CTL)を HLA-A2402 に対応するテトラマーを用いて定量的に解析した。移植後、EBV の再活性化をみた 7 例中、4 例において EBV 特異的 CTL を検出できた。その経時的モニタリングは移植後の B リンパ球増殖性疾患(BLPD)の発症、予後予測に有用と考えられた。

A. 研究目的

HLAA-24 に対応する 5 種類の EBV 由来ペプチドを用いて、造血幹細胞移植後 EBV 特異的 CTL が検出できるか検討する。さらに経時的なモニタリングにより EBV ゲノムコピー数及び臨床経過を比較し、その有用性を検討する。

B. 研究方法

対象は ATG を前治療に用いて非血縁者間骨髄移植を受けた小児血液疾患 15 症例で、移植後 50 日から 90 日を経過した末梢血もしくは骨髄の単核球を用いた。抗体は、MBL 社より提供された LMP2(IYVLVMLVL)、BRLF1(TYPVLEEMF)、BMLF1(DYNFVKQLF)、EBNA3A(RYSIFFDYM)、EBNA3B(TYSAGIVQI)を用いた。これにより CD8 陽性/テトラマー陽性の細胞をフローサイトメトリーにより定量化した。なお、検体の採取に当たっては、患者もしくはその家族からの同意を得て行った。

C. 研究結果

移植後、EBV の再活性化をみた 7 例中、4 例において EBV 特異的 CTL を検出できた。また明らかな BLPD を発症した患者において、特異的 CTL の経時的変化は、臨床症状およ

び EBV ゲノムコピー数の変化とよく一致していた。

D. 考案

1. 5 種類のテトラマーを用いての検討では、BRLF、BMLF、EBNA3A に対する抗体の有用性が確認できた。
2. 患者によりモニタリングに適した抗体は異なる可能性があり、複数の抗体を組み合わせる必要があるかもしれない。
3. EBV 特異的 CTL の出現は、EB ウイルスの増殖を抑制し、EBLPD の発症を予防できると考えられた。よって移植後 EBV 特異的 CTL をモニタリングすることで、致死的な急性 GVHD 発症の危険性があるドナーリンパ球輸注(DLI)を回避できる可能性がある。

E. 結論

HLA/テトラマー複合体により EBV 特異的 CTL の検出と分離が可能になった。現在、体外で増幅する至適条件の検討を行っている。今後、good manufacturing practice(GMP)基準に順守していく形でシステムを確立していく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Induction of complete remission of hypoplastic leukemia with antithymocyte globulin.
Yoshimi A, Nakamoto C, Nakamura Y, Kato K, Matsuyama T, Kudo K, Kojima S.
Int J Hematol 77, 277-281, 2003
- 2) Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down syndrome
Xu G, Nagano M, Kanezaki R, Toki T, Hayashi Y, Taketani T, Taki T, Mitui T, Koike K, Kato K, Imaizumi M, Sekine I, Ikeda Y, Hanada R, Sako M, Kudo K, Kojima S, Ohneda O, Yamamoto M, Ito E
Blood 102, 2960 – 2968, 2003
- 3) Autoantibodies frequently detected in patients with aplastic anemia.
Hirano N, Butler MO, von Bergwelt-Baildon MS, Maecker B, Schultze JL, O'Connor KC, Schur PH, Kojima S, Guinan EC, Nadler LM
Blood 102, 4567-4575, 2003
- 4) Comprehensive analysis of gene alterations in acute megakaryoblastic leukemia of Down's syndrome
Hirose Y, Kudo K, Kiyoi H, Hayashi Y, Naoe T, Kojima S
Leukemia 17, 2250-2252, 2003

- 5) Twenty years' experience in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in the Nagoya Blood and Marrow Transplantation Group.
Iida H, Sao H, Kitaori K, Gotoh S, Yazaki M, Kojima S, Wakita A, Morishima Y, Kodera Y, Morishita Y.
Int J Hematol 79, 79-84, 2004
- 6) Diamond-Blackfan anemia in Japan: clinical outcomes of prednisolone therapy and hematopoietic stem cell transplantation.
Ohga S, Mugishima H, Ohara A, Kojima S, Fujisawa K, Yagi K, Higashigawa M, Tsukimoto I; Aplastic Anemia Committee, Japanese Society of Pediatric Hematology.
Int J Hematol 79, 22-30, 2004
- 7) High-dose Busulfan is a major risk factor for ovarian dysfunction in girls after stem cell transplantation
Maeda N, Kato K, Matsuyama T, Kojima S, Ohyama K
Clin Pediatr Endocrinol 12, 13-18, 2003

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

造血幹細胞の骨髄内直接移植法に関する研究

分担研究者 池原 進 関西医科大学 病理学第一講座教授

研究要旨 難病のモデル動物（マウス、ラット、ウサギ等）を用いて、骨髄内骨髄移植(IBM-BMT)によって、種々の難病が治療できることを証明した。さらに、ヒトへの応用を視野に入れて、実験用カニクイザルを用いて、灌流法とIBM-BMTの安全性と有効性を確認した。

A. 研究目的

本研究の目的は、小動物並びにモンキーを用いて骨髄内骨髄移植(IBM-BMT)の有効性と安全性を確認し、ヒトへ応用することにある。

B. 研究方法

小動物（マウス、ラット、ウサギ等）を用いて、IBM-BMTと従来の静脈内移植(IV-BMT)の有効性を比較する。小動物は、正常のものから、難病のモデル動物を用いる。ヒトへの応用を視野に入れて、実験用カニクイザルを用いて、灌流法とIBM-BMTの安全性を確認し、最善のconditioning regimenを決定する。

（倫理面への配慮）

実験動物を使用するにあたっては、本学の動物センターの委員会の承認を受け、実施する。サルで、申請者らが新しく発見した方法の妥当性を十分に確認してから、ヒトへ実施する。当大学には倫理委員会が設置されており、将来、ヒトに実施するには、委員会の承認を得るとともに、患者と家族に対するインフォームド・コンセントを得て実施する。

C. & D. 研究結果及び考察

- ①ウサギを用いて、IBM-BMTにより、アロの皮膚の移植に成功 (Plast. Reconstr. Surg. 111:291, 2003)。
- ②SCID/hu異種キメラマウスにおいて、ヒト臍帯血をIBM-BMTすることによって、homing receptorsを有しないCD34⁺細胞（最も未熟な造血幹細胞）でも、高率にヒトの造血系を再建できることを発見 (Blood 101:2924, 2003)。
- ③ラットを用いて、アロの組合せで下肢の移植(移植の中で最も難しい複合移植)に成功 (Transplantation76:1543, 2003)。
- ④脈絡膜の血管の新生は、骨髄細胞から生じる (Stem Cells 22:21, 2004)。
- ⑤IBM-BMTを用いることにより、GvH反応を抑制し、生着不全を防ぐことが可能 (Stem Cells 22: 125, 2004)。

以上の公表結果以外に、肺気腫や悪性腫瘍の治療の開発にも成功している。さらに種々のモデル動物を用いてIBM-BMTの適用疾患の拡大を目指す。また、ヒトへの応用を視野に入れてサルの実験を精力的に行う。

E. 結論

IBM-BMTと灌流法（長管骨〔上腕骨等〕に2か所、骨髄針を挿入し、片方から生食で骨髄内を灌流する方法）の組み合わせは、GvH反応も生着不全も起らず、最善の移植方法と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

（国内）

1. 池原進：自己免疫疾患における再生医療としての造血細胞移植. 日本炎症・再生医学会雑誌 123:110-115, 2003.
2. 池原進：骨髄内骨髄移植とその有用性. 臨床免疫 39:74-79, 2003.

（国外）

1. Susumu Ikehara: A novel strategy for allogeneic stem cell transplantation: perfusion method plus intra-bone marrow injection of stem cells. Exp. Hematol. 31: 1142-1146, 2003. (Review)
2. Susumu Ikehara: A new concept of stem cell disorders and their new therapy. J. Hematotherapy & Stem Cell Res. 12:643-653, 2003. (State-of-the-Art Review)

2. 学会発表

（国内）

1. 池原 進：自己免疫と幹細胞
2003年4月 第26回日本医学会総会
シンポジウム
2. 池原 進：自己免疫疾患に対する骨髄移植
—新しい方法を用いて—
2003年5月 第51回日本輸血学会総会
シンポジウム

（国外）

1. 15年 6月 The XIIth International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2003 招聘講演（日本）
2. 16年 2月 7th International Symposium on Molecular Basis of Predictive Oncology and Intervention Strategies 招聘講演（フランス）

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

A Method of Inducting Immunological Tolerance
特開2001-172188
特願09-531891

2. 実用新案登録

骨髄液採取セット及び骨髄針
特願2001-241586
平成13年8月9日（未）
権利者名：株式会社日本抗体研究所

悪性腫瘍の治療方法

特願2003-49198
平成15年2月26日（未）
権利者名：関西TLO株式会社

研究要旨

臍帯血移植では大多数の移植後患者にサイトメガロウイルス抗原血症の陽性化を認めるものの、臨床的には感染症は重篤化しない。今回の細胞性免疫の解析結果は、骨髄移植後と異なり CD4 陽性リンパ球が重要な役割を果たしていることが示唆された。

A. 研究目的

医科研における臍帯血移植の臨床成績から以下の点が示唆されている。

1. HLA 不一致であるが、骨髄移植に比べて急性 GVHD は軽度であり、急性 GVHD II 度以上でもステロイドによる治療が不要である場合が多い。2. 大多数は移植後に CMV 抗原血症の陽性化を認め、抗ウイルス療法を早期に開始するものの、CMV 感染症の発症には至らず、移植後の生命予後は良好である。

すなわち、臍帯血移植後に回復する免疫系は、骨髄移植の場合とは異質である可能性が考えられている。

今回我々は、移植後の末梢血メモリーTリンパ球の回復過程について、CMV 反応性 Tリンパ球についての解析をおこない、臍帯血移植後における本抗原特異的な T細胞性免疫の回復動態について検討した。

B. 研究方法

対象患者は、造血器悪性疾患に対して骨髄破壊的前処置を用い、移植細胞が生着したことが確認できた、臍帯血移植後の患者 16 名と骨髄移植患者 8 名であり、移植後 4 ヶ月まで 1 カ月ごとに末梢血について解析を行なった。正常コントロールは、健康人 10 名を用いた。

各解析時点での白血球数、およびその分画、リンパ球表面マーカーなどを測定し、さらに採血後に分離した末梢血単核細胞を、CD28 抗体存在下で不活化した CMV 抗原と 16 時間共培養した後に、IFN- γ の細胞内染色を行い、フローサイトメーターで解析を行なった。

C. 研究結果

1. 骨髄移植と比べ、臍帯血移植後では早期に CD4⁺ T 細胞数の回復を認める傾向にあった。2. 臍帯血移植後の患者では全例で移植後 7 週以内に CMV 抗原血症が陽性化した。3. 骨髄移植に比べ臍帯血移植では多くの場合に CMV 反応性 CD4⁺ T 細胞が、移植後早期 (30 日頃) に検出された。一方で、CMV 反応性 CD8⁺ T 細胞は 16 例中 2 例で認めた。
4. CMV 反応性 CD8⁺ T 細胞は、CD45RA(-)CD62L(+) (effector memory 分画) が主体であった。

D. 考察

骨髄移植に比べて臍帯血移植後では、CMV 反応性 CD4⁺ T 細胞が早期から末梢血中に認められ、一部では CMV 反応性 CD8⁺ T 細胞の回復も認められ、抗ウイルス細胞性免疫が臍帯血移植後においても機能している可能性が示唆された。今後、解析を重ね、臨床結果との関連について検討するとともに、機能的解析を加えて検討する予定である。

E. 結論

臍帯血移植後には、従来の骨髄移植後に認められる場合とは異なるパターンの細胞性免疫の回復がおり、CD4⁺ Tリンパ球が重要な働きを担っている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

今後、臍帯血移植が標準的治療への位置づけを得るためには、前方視的臨床試験の計画及び早期遂行が望まれる。

G. 研究発表

1. Nagayama, H., Misawa, K., Tanaka, H., Ooi, J., Iseki, T., Tojo, A., Tani, K., Yamada, Y., Kodo, H., Takahashi, TA., Yamashita, N., Shimazaki, S. and Asano, S. Transient hematopoietic stem cell rescue using umbilical cord blood for a lethally irradiated nuclear accident victim. *Bone Marrow Transplantation* 29: 197-204, 2002.
2. Tomonari A, Iseki T, Ooi J, Takahashi S, Shindo M, Ishii K, Nagamura F, Uchamaru K, Tani K, Tojo A, Asano S. Cytomegalovirus infection following unrelated cord transplantation for adult patients: a single institute experience in Japan. *Brit J Haematol* 121: 304-311, 2003
3. Tomonari A, Takahashi S, Iseki T, Ooi J, Yamada T, Takasugi K, Shimohakamada Y, Ohno N, Nagamura F, Uchamaru K, Tani K, Tojo A, Asano S. Herpes simplex virus infection in adult patients after unrelated cord blood transplantation: a single institute experience in Japan. *Bone marrow transplant. In press*
4. Ooi J, Iseki T, Takahashi S, Tomonari A, Ishii K, Takasugi K, Shimohakamada Y, Ohno N, Uchamaru K, Nagamura F, Tojo A, Asano S. Unrelated cord blood transplantation for adult patients with de novo acute myeloid leukemia. *Blood in press*
5. Ooi J, Iseki T, Takahashi S, Tomonari A, Ishii K, Takasugi K, Shimohakamada Y, Ohno N, Uchamaru K, Nagamura F, Tojo A, Asano S. Unrelated cord blood transplantation for adult patients with advanced myelodysplastic syndrome. *Blood* 101: 4711-4713, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特になし

Ⅲ. テーマーⅡ

同種末梢血造血幹細胞移植

厚生科学研究補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

「骨髄等を利用した効率的な造血幹細胞移植の運用・登録と臨床試験体制確立に関する研究」

分担研究報告書

同種末梢血幹細胞移植の有用性に関する研究

主任研究者 原田 実根

九州大学大学院医学研究院・臓器機能医学部門内科学講座・病態修復内科学分野 教授

研究要旨：同種末梢血幹細胞移植（PBSCT）の造血幹細胞移植における位置付けを明らかにするため、同種骨髄移植（BMT）と同種 PBSCT の前方視的無作為化比較試験（第Ⅲ相臨床試験）を計画した。対象は同種造血幹細胞移植が適応とされる成人白血病症例で、ドナーは HLA 一致同胞とし、主たる評価項目は time-to-event 解析による無病生存期間及び全生存期間、副次的評価項目は急性及び慢性 GVHD の頻度と重症度、移植後 100 日以内の全死亡および非再発期死亡とする。本研究によって、同種 BMT に比べて同種 PBSCT の有利な点、不利な点が明らかになり、非血縁ドナー同種 PBSCT 実施に向けた基盤データの集積が期待される。

分担研究者

原田実根

九州大学大学院医学研究院病態修復内科

長藤宏司 " 助手

福田隆浩 " 助手

宮本敏浩 " 助手

A. 研究目的

造血幹細胞移植は造血幹細胞の採取源やドナーの違いによって多様化しているが、日本骨髄バンクを介する非血縁ドナー骨髄移植（unrelated donor bone marrow transplantation, UD-BMT）は、白血病などの造血器腫瘍に対する治療法として既に確立されている従来の血縁ドナー骨髄移植（related donor BMT, RD-BMT）と同程度の長期生存率が得られ、治癒的治療法として確立されつつある。一方、自己末梢血幹細胞移植（peripheral blood stem cell transplantation, PBSCT）は、従来の自家骨髄移植に比べて、1) 移植後の好中球や血小板の生着が極めて速やかである、2) 造血幹細胞採取に全身麻酔を必要としない、など有利な点が指摘され、ほぼ 100% 自家骨髄移植にとって替わっている。この有利な点を考慮して、同種 PBSCT も積極的な臨床応用が行われ、同種 BMT の代替法として急速に普及しており、期待できる成績が得られつつある。そこで、次に検討すべきものとして、非血縁ドナーからの PBSCT が最重要課題として考えられ、既に欧米では臨床応用が開

始されている。したがって、同種 BMT と同種 PBSCT を比較検討し、それぞれ有利な点、不利な点を明らかにし、それぞれの適応を明確にしていく必要がある。この比較検討によってエビデンスを得るためには、前方視的無作為化比較臨床試験（第Ⅲ相臨床研究）が不可欠である。また、同種 BMT 及び同種 PBSCT の成績を向上させるための検討もさらに必要である。

B 研究方法

同種 BMT と同種 PBSCT の臨床第Ⅲ相非盲検無作為割付比較試験

1. 目的：同種造血幹細胞移植を受ける患者及びドナーを対象に無病生存率、全生存率、急性 GVHD 及び慢性 GVHD の頻度と重症度を主要評価項目として、同種造血幹細胞移植が適応とされる成人白血病症例を対象に HLA 一致同胞をドナーとする同種 BMT と同種 PBSCT の有効性と安全性を比較する。

2. 被験者：HLA 一致血縁者間同種造血幹細胞移植のドナーおよびレシピエント。

レシピエントの選択基準は、

1) 同種 BMT が適応になる急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病の患者で病期は問わない、

2) 年齢が 15 歳以上かつ 50 歳以下で移植の支障となる臓器障害がない、

3) 年齢が 10 歳以上かつ 55 歳以下の HLA 一致同胞ドナーの選択基準は、

- 1) HLA 一致の同胞、
 - 2) 年齢 10 歳以上 65 歳以下の者、
 - 3) ドナー又は代諾者が骨髄採取または G-CSF 投与後のアフエーシスのいずれかに無作為に割り付けられることに文書による同意が得られていること、
 - 4) 全身麻酔下の骨髄採取および G-CSF 後のアフエーシスを施行することに支障となる障害を有さないこと、である。
3. 被験者の登録と無作為化の方法：中央割付方式による無作為化（ランダムイゼーション）を行い、原疾患の再発や治療関連死に与える影響を考慮し、原疾患の再発リスクおよび年齢を層とした層別化を行う。
4. 治療計画：ドナー及びレシピエントの両者から同意を得た後、登録被験者は骨髄移植群（BMT 群）または末梢血幹細胞移植群（PBSCT 群）に無作為に割り付ける。移植前治療としては BU/CY もしくは CY/TBI レジメンを用いることを原則とする。その他の治療法を用いる場合には引用可能な論文として公表されている、骨髄破壊的治療を行うこととする。
- 1) PBSCT 群：ドナーに G-CSF を 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ もしくは 400 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ を 1 日 1 回あるいは 2 回に分割して連続 4-6 日間皮下投与し、4-6 日目に 1-2 日間末梢血幹細胞をアフエーシスで採取し、レシピエントに輸注する。移植に必要な CD34 陽性細胞数はレシピエント体重当たり $2 \times 10^6/\text{kg}$ 以上を目標とする。
 - 2) BMT 群：ドナーから全身麻酔下に骨髄穿刺を行い骨髄液を採取し、レシピエントに輸注する。移植に必要な有核細胞数はレシピエント体重当たり $2 \times 10^6/\text{kg}$ 以上を目標とする。移植後の免疫抑制は cyclosporine + 短期 methotrexate の統一したレジメンで実施する。
5. 評価項目
- 主たる評価項目：time-to-event 解析による無病生存期間（leukemia-free survival）及び全生存期間（overall survival）
- 副次的評価項目：
- ① 急性 GVHD の頻度と重症度、
 - ② 慢性 GVHD の頻度と重症度、
 - ③ 移植後 100 日以内の全死亡（day 100 mortality）及び非再発期死亡（treatment-related mortality）
6. 目標症例数：以下の設定根拠により登録期間 2 年間で 1 群 170 例、全 340 例を目標とし、最終症例の登録後 2 年間の追跡観察を行うこととする。尚、以下の設定根拠に用いた変数の不確実性と、研究全体の安全性、

倫理性を考慮し、200 症例目が 6 ヶ月の観察を終了した時点で中間解析を実施する。この時、両群の overall survival に差がないとする帰無仮説を検定し、これが棄却された場合、本研究の症例登録は中止とする。

研究実施期間：2 年間。最終登録症例の移植後 100 日間が経過した時点で副次的評価項目に関する最終解析を行う。最終症例登録後 2 年間の追跡評価を行い、主たる評価項目についての最終解析を行う。

C. 研究結果

「成人白血病に対する HLA 一致同胞ドナーからの同種 BMT と同種 PBSCT の臨床第 III 相非盲検無作為割付比較試験（phase III；confirmatory study）」の試験実施計画書の策定を終了し、症例報告書（CRF）も完成し、症例登録を開始した。シアトルで実施された多数例の無作為化比較試験（Bensinger WJ, et al. N Engl J Med 344:175-181, 2001）、白血病患者の 2 年生存期待率は同種 PBSCT 群 66% に対し、同種骨髄移植では 54% (hazard ratio 1.61; confidence interval 0.98-2.63) であり、無病生存（DFS）はそれぞれ 65% 対 45% (hazard ratio 1.67; confidence interval 1.05-2.63) であった。これらの結果から本試験では time-to-event analysis において two-tailed $\alpha=0.05$ 、 $\beta=0.2$ として hazard ratio = 1.6-1.7 の差を検出できる症例数を設定することとした。本邦における HLA 一致同胞間の同種骨髄移植による 2 年生存率を 60% と仮定すると、hazard ratio = 1.6-1.7 となる同種末梢血幹細胞移植の 2 年生存率は 72.7-74.0% に相当する。また、同様に同種骨髄移植群の 2 年無病生存割合が 50% とすると、同種末梢血幹細胞移植群では 64.8-66.5% に相当する。これらの推定から、症例登録期間を 2 年間とし、最終症例の登録後 2 年間観察を行うと、必要症例数は全生存で 1 群 131-161 例、DFS で 106-132 例と計算される。実際には、これらの推定値に脱落症例や解析不能例を 10% 程度上乗せした症例数が必要とされる。そこで、本試験計画書では、主たる評価項目には time-to-event 解析による無病生存期間および全生存期間、副次的評価項目は急性 GVHD と慢性 GVHD の頻度と重要度及び移植後 100 日以内の全死亡及び移植に関連した非再発死亡とすることにした。目標症例数は登録期間 2 年で 1 群 170 例、全 340 例を目標と設定した。2004 年 2 月の時点で 13 例の症例登