

要約

- 1997-2002年に東大医科研で施行したAML・CML・MD3患者に対するG-CSF併用前処置を用いた非血縁者ドナーによる調帯血(n=37)・骨髓移植(n=29)の比較をおこなった。中央観察期間はCBT19ヶ月、BMT20ヶ月(P=0.3)。
- 調帯血移植では好中球・血小板の回復は有意に速く、37例中1例に生着不全を認めた。
- 急性GVHDの発症頻度は調帯血移植で少ない傾向を示し(統計学的には有意差なし)、骨髓移植後の死亡13例中6例(46%)でその原因にGVHDが関与していた一方、調帯血移植ではGVHD関連死亡例は認めず、TRMも有意に低かった。
- 再発率に差は認めなかったが、進行病期群における無病生存率は調帯血移植で有意に高かった。また、非進行期群における無病生存率は調帯血・骨髓移植ともに80%以上であり、G-CSF併用前処置法の高い安全性および抗腫瘍効果が等与している可能性が示唆された。
- 調帯血移植後のT細胞回復は、その免疫学的成熟過程および細胞機能面からみて特異的であり、CMVに対する細胞性免疫能の獲得は、比較的早期に得られることが示唆された。

平成15年度厚生労働科学研究プログラム・再生医療等研究事業
「食細胞を利用した効率的な造血幹細胞移植の適用・評価と臨床試験体制の確立に関する研究費」第一回委員会(2003年7月12日)

FK506をGVHD予防に用いたNIMA相補の血縁者間
造血幹細胞移植に関する臨床第I-II相試験

一戸 辰夫¹、内山 卓¹、
玉木 茂久¹、丸屋 悦子²、佐治 博夫³
¹京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科、²山田赤十字病院 内科、
³NPO HLA研究所

JHE, 12, 2003

難治性造血器腫瘍に対するFK506をGVHD予防に
用いたT細胞非除去NIMA相補の血縁者間移植

「母子間・NIMA相補の同胞間HLA不一致移植調査」2001年6月～2002年2月まで、
12施設より73例を集計(玉木茂久他、平成14年度小児科第二回学会誌)。

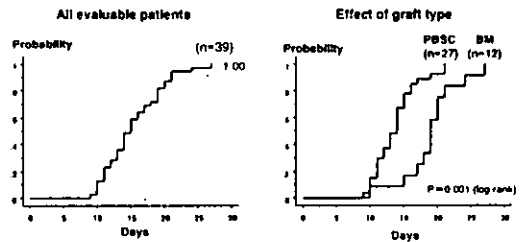
このretrospective cohortから、下記の条件を満たす10例を抽出し、
(1) Product-limit推定法による移植成績(生存・急性GVHD・生存)の解析
(2) 比例ハザードモデルによる急性GVHD・生存に関するリスク因子の解析
を行った(StatView ver3.0)。

- GVHD方向にHLA-A, B, DRが血清学的に2抗原以上不一致
+ 原疾患が造血器悪性腫瘍
+ 初回移植として実施
+ GVHD予防にFK506を使用

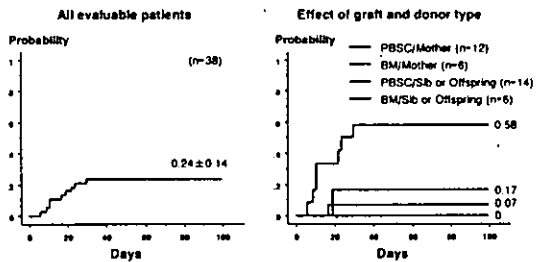
Patient Characteristics
(GVH MM>1 Ag, n=39)

Demography		
Sex (male/female)		16/23
Age (years), median (range)		26 (0-58)
Diagnosis		
AML/MDS/CML		12/1/7
ALL/NHL/ATL		13/4/2
Status at transplant		
Chemosensitive (CR/PR/CP)		17
Chemosensitive (Refractory)		22
Stem cell source		
BM		12
PBSC		27
Conditioning		
Containing TBI		27
No TBI		12
GVHD prophylaxis		
FK506±MTX		25
FK506+MTX+others		14

Cumulative Incidence of neutrophil engraftment (ANC \geq 5 \times 10⁹/L)



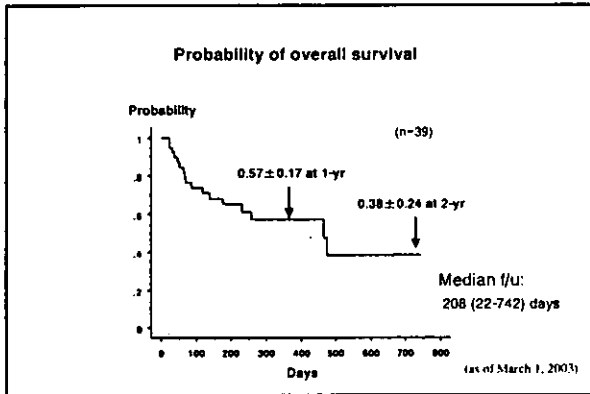
Cumulative Incidence of grades III-IV acute GVHD



Multivariable analysis of factors potentially
associated with grades III-IV acute GVHD

Variable	HR (95% CI)	P*
Number of GVH mismatches		
2 antigens	1.00	
3 antigens	0.66 (0.15-2.79)	.569
Type of donor		
Sib/Offspring	1.00	
Mother	20.0 (2.15-200)	.008
Donor-recipient sex mismatch		
F to M	1.00	
F to F / M to F or M	1.92 (0.47-7.83)	.363
Type of graft		
BM	1.00	
PBSC	6.99 (0.76-62.5)	.085

*Two-sided Wald test



Univariable analysis of factors potentially associated with survival

Variable	HR (95% CI)	P*
Number of GVH mismatches	2 antigens	1.00
	3 antigens	1.14 (0.40-3.28)
Type of donor	Sib/O/spring	1.00
	Mother	1.16 (0.45-3.04)
Disease status at transplant	Chemoresistive	1.00
	Chemoresistant	1.02 (0.39-2.69)
Type of graft	BM	1.00
	PBSC	2.33 (0.67-8.13)
Conditioning	TBI-containing	1.00
	No TBI	1.31 (0.48-3.58)

*Two-sided Wald test

Causes of death

	Disease status at SCT		Probability of TRM 0.34 ± 0.16 at 2-yr
	CR/PR/CP (n=17)	Refractory (n=22)	
Relapse or disease progression	0	5] Probability of TRM 0.34 ± 0.16 at 2-yr
GVHD	1	4	
Infectious complications	5	1	
RRT	1	0	

(as of March 1, 2003)

NIMA相補的血縁者移植: 前向き臨床試験の概要

目的: 進行期白血病に対してのHLA-2,3抗原不一致NIMA相補的血縁者をドナーとするFK506+MTXをGVHD予防に用いたT細胞非除去造血幹細胞移植の実施可能性と有効性の検討。(第I-II相試験)

主評価項目: • 移植後100日以内死亡(第I相)
• 移植後1年以内死亡(第II相)

実施可能性(安全性)の基準: • III度以上急性GVHD ≤ 25%
• Day 100生存率 ≥ 70%

有効性の基準: • 1年生存率 = 40 ± 15%

第I相登録症例

Diagnosis	Relata	Age	Sex	PS	Conditioning
R-001	AML	REL2	15 F	0	FLU/MEL/TBI
R-002	CML	BP	14 M	0	CA/CY/TBI
R-003	AML	REL1	20 F	0	CY/TBI

第I相登録ドナー

Relationship	Age	Sex	HLA disparity		Graft	
			GVH	HVG		
D-001	Mother	33	F	2	2	PBSC
D-002	Mother	48	M	2	2	Marrow
D-003	Sibling	21	M	3	2	PBSC

登録症例の中間経過

	Engraftment	aGVHD	Current status
R-001	+	0	Alive with disease (day 123+)
R-002	+	1	Alive in CR (day 68+)

緊急報告の対象となる有害事象の発生はこれまで認めず。
今後、10例目が登録された時点で、第I相を終了の予定。
第II相においては、対象疾患の見直しを検討。

厚生科学研究所 (厚生科学研究所ヒトゲノム・再生医療等研究所)
 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 (小倉良典 代表)
 平成18年7月12日名古屋第一赤十字病院

HLA2、3抗原不一致血縁者間 同種造血幹細胞移植に関する研究

～CD34陽性細胞純化法を用いたHLA2、3抗原不一致血縁者ドナーからの同種末梢血幹細胞移植の安全性及び有効性の検討～

【試験デザイン】

多施設共同による第I/II相臨床試験
 (非対照非盲検)

CD34陽性細胞純化については、麒麟麦酒株式会社の治験とする。

【対象疾患】

以下の何れかの疾患を有する患者。

- 1) 急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病
初回あるいは再発後の寛解導入不応例
- 2) 慢性骨髄性白血病
移行期例、または急性転化例

【ドナー適格基準】

以下の基準を満たす健康状態が良好な者を対象とする。

- (1) 患者の4親等以内の血縁者である者
- (2) 患者とのHLAが血清型で2抗原あるいは3抗原異なるドナーである者。なお、不一致の対象となるHLA抗原はHLA-A、B、DRとする。

なお、ドナーの適格基準・採材基準は、腎臓移植用幹細胞のための寛容ドナーからの末梢血幹細胞の採取・採取に関するガイドライン(日本造血細胞移植学会、日本造血学会、2020年7月21日改訂版)をもとに設定した。また、各施設採材及び末梢血幹細胞の採材の基準に関しては、日本造血バンク、コーディネーターマニュアル「ドナー適格性判定基準(2021年7月1日版)」を参考に設定した。

移植前処置

	Day 10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
Fludarabine 30mg/m ²					↓	↓	↓	↓	↓		
Thiotepa 5 mg/kgx2					↓	↓					
Thymoglobulin 2.5mg/kg							↓	↓	↓	↓	
TBI 12Gy (↓)(↓)			↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

4分ない、6分刻

GVHD予防 CSA単独

CSA 3mg/kg/dayの持続投与をday-1から開始する
 血中濃度250~400ng/mL

腎機能増悪によりシクロスポリンを中止した場合には
 適量プレドニゾン 1mg/kg/dayなどによるGVHD予防を行う
 Grade II (付録2参照)以上のGVHDが認められた場合は
 メチルプレドニゾン1~2mg/kg/dayの投与を開始する。

評価項目
1. 主要評価項目(primary endpoint) 移植後35日以内の生着率
2. 副次的評価項目
1) 急性GVHDの発症頻度および程度
2) 前処置関連毒性
3) 感染症発症頻度と起炎菌
4) 移植後100日時点での生存率、無病生存率、非再発死亡率
5) 移植後100日時点での原疾患の再発または増悪
6) 移植後100日時点での染色体キメリズム
7) 有害事象

【目標症例数】														
19例														
【参加施設】														
<table border="0"> <tr> <td>国立がんセンター中央病院</td> <td>虎の門病院血液科</td> </tr> <tr> <td>東京都立駒込病院血液内科</td> <td>慶応大学血液感染リウマチ科</td> </tr> <tr> <td>東京医科歯科大学小児科</td> <td>富山県立中央病院内科</td> </tr> <tr> <td>名古屋第一赤病院第4内科</td> <td>九州がんセンター小児科</td> </tr> <tr> <td>大阪府立母子センター小児内科</td> <td>九州大学第一内科</td> </tr> <tr> <td>九州大学第一内科</td> <td>北九州市立医療センター内科</td> </tr> <tr> <td>浜の町病院血液病科</td> <td>原三徳病院血液内科</td> </tr> </table>	国立がんセンター中央病院	虎の門病院血液科	東京都立駒込病院血液内科	慶応大学血液感染リウマチ科	東京医科歯科大学小児科	富山県立中央病院内科	名古屋第一赤病院第4内科	九州がんセンター小児科	大阪府立母子センター小児内科	九州大学第一内科	九州大学第一内科	北九州市立医療センター内科	浜の町病院血液病科	原三徳病院血液内科
国立がんセンター中央病院	虎の門病院血液科													
東京都立駒込病院血液内科	慶応大学血液感染リウマチ科													
東京医科歯科大学小児科	富山県立中央病院内科													
名古屋第一赤病院第4内科	九州がんセンター小児科													
大阪府立母子センター小児内科	九州大学第一内科													
九州大学第一内科	北九州市立医療センター内科													
浜の町病院血液病科	原三徳病院血液内科													

データ管理
日本臨床研究支援ユニット(J-CRSU)
<ul style="list-style-type: none"> ■ 特定非営利活動法人 ■ 2001年6月設立 ■ 代表者・・・大橋靖雄 ■ 目的・・・統計・情報処理及び品質保証の観点から、我が国の臨床研究の質の向上に寄与する事業を行い我が国の保健・医療の増進に寄与する。 ■ プロジェクトマネージメント・・・齋藤明子⇒岩永正子 ■ データマネージメント・・・酒井淳子、栗原雅明

試験開始準備・懸案事項など -1
<ul style="list-style-type: none"> ■ protocolの見直し(済) <ul style="list-style-type: none"> ▶ 臍帯血移植の台頭 ▶ クリニマックスの治験外使用の経験 ▶ 末梢血幹細胞ドナーの有害事象報告 ■ protocolの見直し(未) <ul style="list-style-type: none"> ▶ 小児該当箇所(担当者:河敬世先生) <ul style="list-style-type: none"> ▶ 試験薬剤投与量 ▶ フォローアップ項目、期間など

試験開始準備・懸案事項など -2
<ul style="list-style-type: none"> ■ システム整備 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 薬剤管理システムの整備⇒済 ▶ 事務局整備⇒済? ▶ 検体搬送システムの整備⇒契約済 ▶ 安全性情報報告システムの整備⇒契約済 ■ 症例報告書、同意説明文書など試験関連資料改訂 <ul style="list-style-type: none"> ▶ プロトコール改変(小児該当箇所)に併せ若干の変更が必要

試験開始時期
<ul style="list-style-type: none"> ■ 2003年7月(班会議終了後に資料配布可能なように準備を進めております) <ul style="list-style-type: none"> ▶ 「医師主導の治験の実施の基準」施行に従い、必要書類・システムなどの見直しが必要になる可能性あり

HLA class-1 抗原 2 座不一致同胞ドナーより RIST を行った

重症再生不良性貧血の 1 例

市立函館病院 内科・血液科 政氏伸夫、三浦卓也、金森弘恵、堤 豊、小原慎司、松嶋 喬
特定非営利活動法人 HLA 研究所 佐治博夫

[はじめに] NIMA/IPA コンセプトに基づいた多座不一致血縁ドナーからの移植は、現在までのところ非寛解例や生着不全例でのサルベージ的状況での施行が多く、さらに非腫瘍性疾患患者での報告は少ない。また我々の知る限りでは、NIMA 相補 2 座不一致同胞ドナーからの RIST の報告例は無い。今回我々は、発症後 25 年を経過し各種の免疫抑制療法に不応、すでに長期間にわたり輸血依存となった再生不良性貧血患者に対して、HLA class-1 抗原 2 座不一致同胞ドナーから RIST を行い、良好に経過している症例を経験したので報告する。

[症例] 38 歳、男性。13 歳時(昭和 52 年)に再生不良性貧血を発症。その後、ステロイドパルス療法、蛋白同化ステロイドホルモン等の治療を行うが効果はなく輸血にて対処していた。平成 13 年に ATG と CyA による免疫抑制療法も行ったが効果は無かった。平成 14 年 7 月に発熱、腰痛にて外来受診。左腎膿瘍の診断にて入院。抗生剤のほか G-CSF の投与を行い 2 ヶ月ほどで、CRP の陰性化を確認したが、G-CSF の投与を中止すると顆粒球数は $500/\mu\text{l}$ 以下となり、痔ろう等の慢性炎症の増悪を見るような状態であった。血小板数も常に $2000/\mu\text{l}$ 以下で出血症状もあり、すでにランダム血小板製剤不応のため HLA-PC の輸血を要していた。G-CSF の連日投与にても白血球数は 1000 前後を保つのみで、すでにリンパ球も少数で、高度の汎血球減少、骨髄不全ともいえる状況であった。既に家族同胞内でのドナー検索は以前に行われており HLA 一致ドナーは無いとの判断であったが、患者・家族からの非血縁者間移植の希望も無かったため、骨髄バンクへは登録を行わない方針となっていた。しかし、今回はこのまま保存的な治療を継続しても、いずれ感染症死、あるいは出血死は免れないことを家族に伝えたところ、移植を希望されました。しかし、複数の非血縁者間骨髄移植実施施設、臍帯血移植実施施設から移植適応は無いと断られ、治療に関して手詰まりの状態となっていました。以前まで HLA 2 座不一致でドナー候補とはならないと考慮されていた実姉が母親由来非遺伝 HLA 相補的ドナーであることが判明したため、NIMA 相補 class-1 抗原 2 座不一致移植の可能性を検

討し、実姉の末梢血単核細胞中に患者と同じ HLA を持つ細胞を 1 / 1000 ~ 10000 検出しました。長年にわたる輸血によるヘモジデロシスもあり、患者の全身状態を考慮すると、RIST であれば移植可能ではあるが、RIST については前例も無く成功率は 10% 前後かも知れないと説明し、家族内の協議の末、最終的に母子間では無く姉弟間での RIST を行うこととなった。当院の院内倫理委員会にて前処置および GVHD 予防等に関するプロトコールの検討を行い、本例の移植の実施の承認を得た後、ドナー末梢血幹細胞を 1 月下旬に採取・冷凍保存を行った。3 月 6 日よりフルダラビン (30mg/m²/day x 5days)、ATG (アールプリン) (5mg/kg/day x 3days)、全身放射線照射 (2Gy x 3) の前処置を行い、3 月 13 日、14 日 (day 0, 1) に患者体重あたり 5×10^6 個の CD34 陽性細胞を含むドナー末梢血幹細胞を輸注。急性移植片対宿主病に対しては「FK506 を GVHD 予防に用いた非遺伝母 HLA 抗原 (NIMA) 相補的血縁者間造血幹細胞移植に関する臨床 I - II 相試験」に準じて、プログラフの 24 時間点滴を day -1 からとメトトレキサートの静注を 15 日 (day 2)、17 日 (day 4)、21 日 (day 8) に静注した。白血球回復促進目的にて 3 月 14 日 (day 1) よりグラン 500 μ g の点滴静注を開始。3 月 27 日 (day 14) になっても白血球数は 100 であり生着不全も心配されたが、3 月 28 日 (day 16) には白血球数は 7300 まで回復、血液像上も顆粒球を確認したため、生着と判断。血小板輸血は 4 月 8 日 (day 26) が最終輸血日、赤血球輸血は 4 月 2 日 (day 20) が最終となり、その後輸血は不要となった。4 月 29 日 (day 47) には赤血球数 274 万、ヘモグロビン 8.9、白血球数 4900、血小板数は 8.2 万と順調な回復を示し、4 月 24 日 (day 42) に施行した骨髄穿刺では、有核細胞数 13 万、巨核芽球数 66 と骨髄も良好な回復を示していた。5 月に入って徐々に血小板数が減少し 6 月 9 日 (day 88) に 5.3 万となった。末梢血リンパ球の各分画のキメリズムは 100% ドナー型であり慢性 GVHD による血小板減少と診断。6 月 10 日 (day 95) よりプレドニゾン 20 mg / 日の服用を開始した。6 月 16 日 (day 101) には血小板数は 10.6 万 / μ l まで回復した。7 月 1 日現在 (day 109) プレドニゾンによる対糖能障害を呈してはいるが、血液学的には赤血球数 362 万、ヘモグロビン 12.4、白血球数 4600、血小板数は 10.3 万と良好な状態を維持しており、近々退院可能と考えている。

HLA haploidentical ミニ移植

大阪大学大学院医学系研究科 分子病態内科学 小川啓哉

GVHD 方向 HLA2-3 抗原不適合ドナーからの minitransplantation が、FK506+mPSL を GVHD 予防に用いることにより、施行可能であることを前回の班会議で報告した。今回は、first transplantation 15 例と、second transplantation(同種移植後の再発や拒絶)の 13 例を呈示し、新しい移植法として、成立し得るかどうかを検討した。

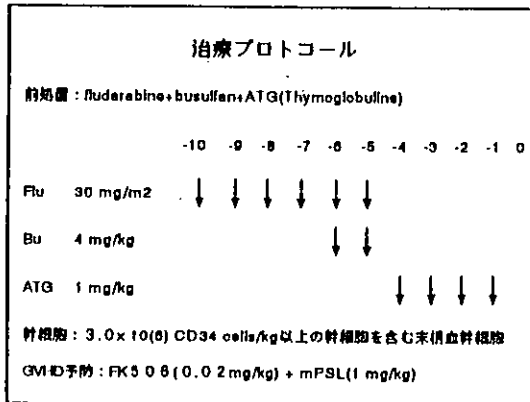
対象

予後不良造血器腫瘍であって、血縁者に HLA1 抗原不適合までのドナーが存在せず、骨髄バンクに HLA 適合ドナーが存在しないか、存在しても、時間的余裕がない症例。

以下のいずれかの理由により、通常の myeloablative な前処置を行えない患者

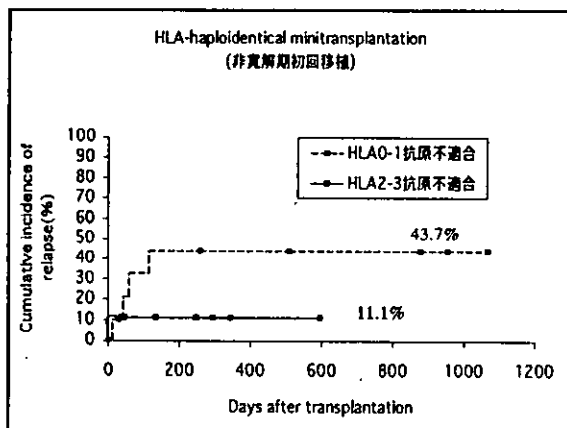
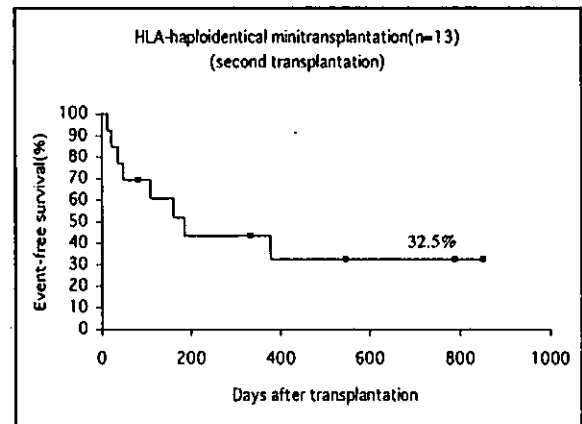
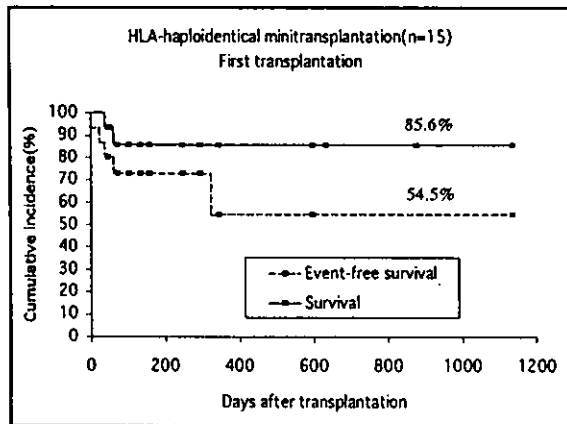
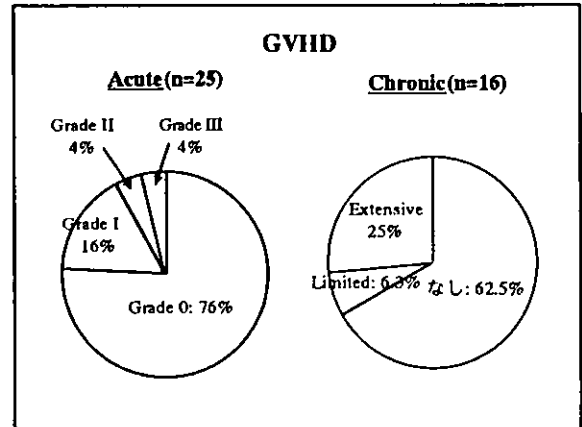
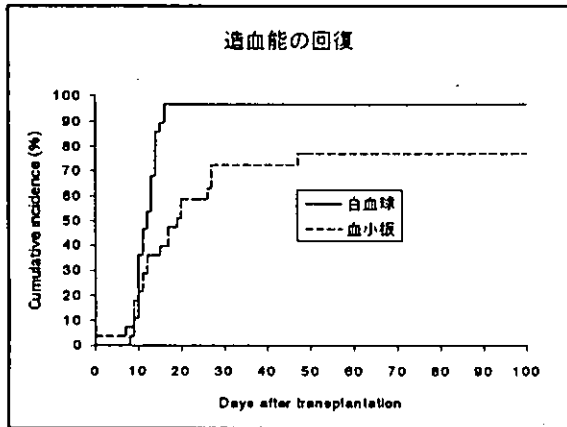
1. 45 歳から 65 歳(40-44 歳は optional)
2. 通常の骨髄破壊的前処置に耐えられないと判断される合併症を有する。具体的には、以下のような症例を指す。
 - a) 真菌感染などの感染病巣が存在する症例
 - b) 大量エンドキサン投与ができない心筋障害を有する症例
 - c) 肺機能障害(軽度)のため、TBI 照射ができない症例
 - d) 再発や拒絶などのため、再移植が必要な症例

症例



No	Disease	年齢/性	病期	ドナー	不適合抗原数 (GVH/IVG)
A. First transplantation					
1	CML	60/F	CP2	Sib(M)	2/2
2	AML	63/M	CP2	Offspring	2/2
3	MDS	42/M	Overt	Sib(U)	2/3
4	MDS	29/M	Overt	Sib(M)	3/3
5	AML	41/M	CP2	Sib(P)	3/3
6	MFL	27/F	Relapse	Sib(M)	2/2
7	MFL	45/M	Relapse	Offspring	3/2
8	atCML	63/M	non CR	Offspring	3/2
9	MDS	64/M	overt	Offspring	2/3
10	AML	62/M	CP2	Offspring	3/2
11	MFL	67/M	Flt	Offspring	3/3
12	AML	44/F	CP2	Offspring	2/2
13	ALL	45/F	CR1 (Ph1)	Offspring	3/3
14	MDS	47/M	Overt	Offspring	2/1
15	My/TK	60/M	Flt	Offspring	2/2
B. Second transplantation					
1	AML	61/F	Relapse	Offspring	2/2
2	HD	27/F	Relapse	Mother	2/2
3	MDS	29/M	Rejection	Sib(M)	3/3
4	MDS	63/F	Relapse	Offspring	2/2
5	ALL	23/F	Rejection	Sib(P)	2/2
6	MDS	63/F	Relapse	Nephew	2/2
7	MDS	64/F	Rejection	Offspring	2/3
8	AML	24/F	Relapse	Sib(P)	3/3
9	AML	17/M	Relapse	Sib(M)	2/2
10	AML	63/M	Relapse	Mother	3/2
11	CML	27/M	Relapse	Mother	2/2
12	AML	33/M	Relapse	Sib(non-I)	3/2
13	AML	32/F	Relapse	Sib(M)	2/2

Sib(M), noninherited maternal antigen-mismatched sibling
 Sib(P), noninherited paternal antigen-mismatched sibling
 Sib(U), unknown about HIMA or NIPA
 Sib(non-I), non-1:1 haploidentical



Summary

1. 評価可能28例中、27例でドナー由来の生着を得た。
2. Neu>500 : Day 12 (range, 8 - 16)
PLT>2万 : Day 19 (range, - 122)
3. Acute GVHD 0度, 19例; 1度, 4例; II度, 1例; III度, 1例
4. Chronic GVHD評価可能16例中4例でextensive
5. 十分に強いGVL効果を得られた。
6. C7-HRP: 陽性率, 74.1%; median, 11.0/50,000 (range, 1.9-1688.1/50,000)
7. EBV-LPD, HHV-6脳炎などの重症ウイルス感染症の発症
8. First移植は、移植後3年で、survival 85.6%, event-free survival 54.5%であった。
9. Second移植は、移植後2年のevent-free survivalで、32.5%であった。

膠原病に対する造血幹細胞移植のための臨床試験体制の 確立と実施に関する研究

北海道大学大学院医学研究科 分子病態制御学講座（第二内科） 分担研究者 小池 隆夫

〔はじめに〕自己免疫疾患は、その発症に自己反応性リンパ球、自己抗体の関与が想定されており多彩な症状を呈する。当施設では、従来の治療法に抵抗性を示す難治性自己免疫疾患に対して、原疾患の進行抑制および治癒を導くことを目的として自家末梢血 CD34 陽性細胞移植併用超大量免疫抑制療法を実施している。これまでに 3 症例に実施し、その評価と免疫学的解析を実施中である。本研究ではそれらの詳細かつ中長期的な予後評価を踏まえ、膠原病に対する本治療の臨床試験体制確立のための研究を行う。

〔対象と方法〕現時点で本治療法を実施した症例は、当院適応基準を満たし、判定委員会の承認およびインフォームドコンセントの得られた強皮症 3 例である(症例 1: 57 歳男性、症例 2: 19 歳女性、症例 3: 54 歳女性)。末梢血幹細胞動員は、症例 1 は顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)単独、症例 2、3 は cyclophosphamide (CPA) 4g/m²+G-SCF で行い、CD34 陽性細胞を純化、凍結保存した。移植前処置は、何れの症例も CPA 200 mg/kg. で行った。移植前後における臨床症状、血清学的変化を観察するとともに、末梢血単核球について分画および炎症、免疫関連遺伝子発現レベルを FACS、cDNAarray 法を用いて検討し、宿主免疫能の回復と病態の変化との関連を評価している。

〔結果と考察〕移植 CD34 陽性細胞数、純度は、 $3.64 \pm 1.36 \times 10^6$ /kg、 $93.7 \pm 3.11\%$ であり、移植後の造血能回復も速やかであった。合併症は、サイトメガロウイルス抗原血症、出血性膀胱炎、血球貪食症候群等を認めたが、抗ウイルス剤、ステロイド剤投与により軽快した。治療効果は、移植後 1 年で、mRodnan (modified Rodnan total thickness skin score)、mHAQ (modified health assessment questionnaire)において、各々、約 70%、35% の改善を認めた。臓器障害への影響については、呼吸機能検査、GFR は、移植後一過性に機能低下を示したが、何れの症例においても約 12 ヶ月の時点で移植前値への回復が認められた。

現在最長 32 ヶ月までの経過を追跡できており、いずれの症例も外来通院中で原疾患の明らかな再燃・増悪を認めていない。免疫学的には、末梢血単核球において、CD4⁺/CD8⁺比は移植後長期にわたり低値を示したが、CD56⁺、CD19⁺分画の回復は比較的速やかであった。サイトカイン産生能の回復は症例毎に異なる経過を示した。また、末梢血単核球において治療後に IL-1 β 、TNF α 等の発現レベルの低下を認めた。これらの結果を踏まえ、さらに長期的な評価を行うとともに症例を増やし、膠原病に対する本治療法施行の臨床試験体制の確立を目標とした検討を行う。

<表 1> 治療適応時の概略

	症例 1	症例 2	症例 3
性別/年齢	男性/57 歳	女性/19 歳	女性/53 歳
診断	SSc	SSc	SSc
臓器合併症	腎障害、高血圧 (腎クリーゼの既往あり)	皮膚潰瘍 逆流性食道炎	間質性肺炎
罹病期間	1.5 年	3 年	1 年
治療歴	PGE1、ACEI	PSL、D-P、PGE1	PSL、D-P、PGE1
mRodnan TSS	38/51	26/51	25/51

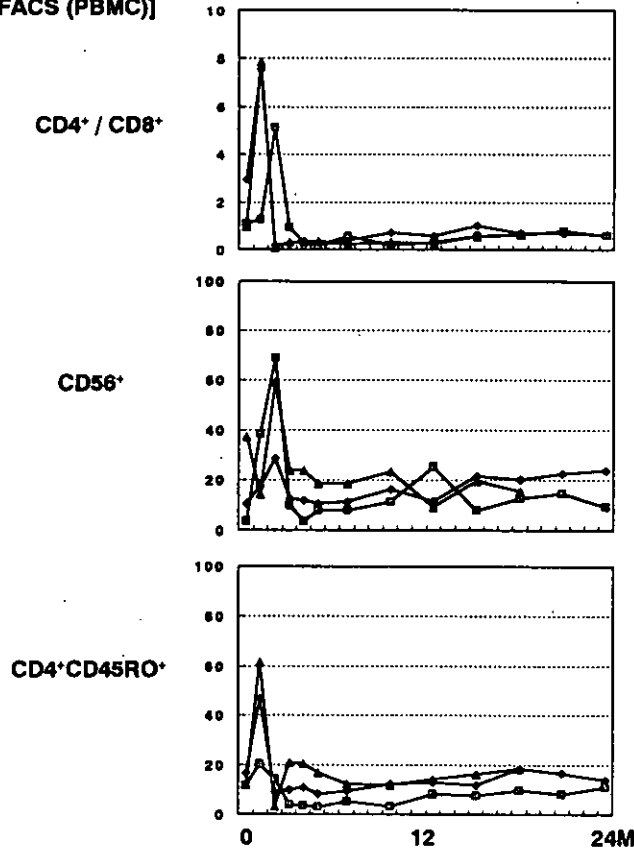
PG : prostaglanin、ACEI : angiotensin converting enzyme inhibitor、D-P : D-penicillamine

<表 2> 造血能の回復と血清学的変化

	症例 1	症例 2	症例 3
造血幹細胞動員	G	CPA+G	CPA+G
移植前処置	CPA	CPA	CPA
CD34 陽性細胞純度	95%	96%	90%
移植 CD34 陽性細胞数*	2.96	5.21	2.75
白血球数 500/ μ l 以上	11 日	9 日	11 日
血小板数 5×10^4 / μ l 以上	15 日	21 日	16 日
抗核抗体(IF)	1:160→1:320	1:1280→1:1280	1:1280→1:160
抗 Scl-70 抗体	7.9→6.9	92.3→196.5	151.2→40.3

G : G-CSF、* : $\times 10^6$ /kg

[FACS (PBMC)]



[PBMCにおける免疫関連遺伝子の発現量変化]

Classification	Gene	Ratio* (fold)
Growth factor & hormones	TGF β	0.73
	PDGF β	0.94
	TNF α	0.31
	IL-1 β	0.20
	IL-4	0.35
	IL-6	0.32
	IL-10	0.28
	IL-12p35	0.41
	IL-15	0.45
	IL-18	0.36
Membrane receptors	IFN γ	0.73
	IL-4R	0.49
	IL-6R	0.60
	IL-10R	0.68
Cell adhesion proteins	IL-15R α	0.47
	VCAM-1	0.43
	ICAM-1	0.44

*移植後6ヶ月/移植前値

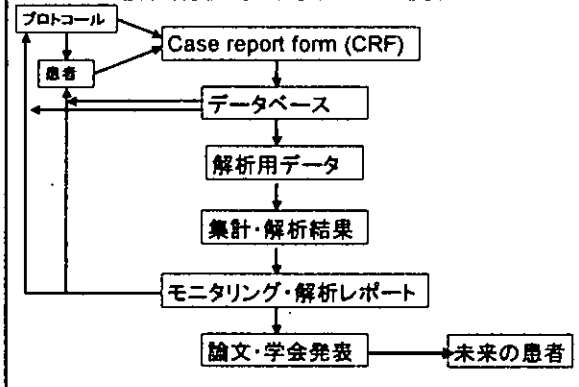
臨床試験におけるデータセンターの役割

名古屋大学大学院医学系研究科 予防医学 / 医学推計・判断学
 熱田由子 田中大介 山本一仁 濱嶋信之

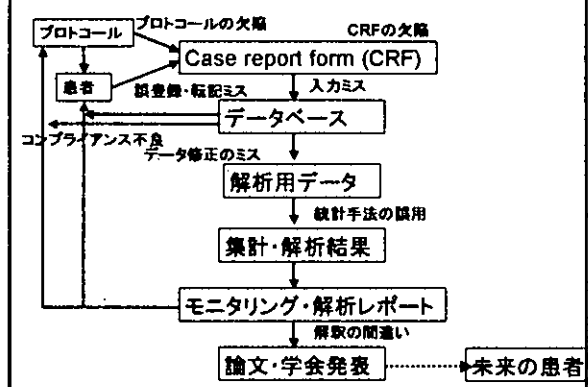
名古屋大学大学院医学系研究科 予防医学 / 医学推計・判断学内

- ・日本造血細胞移植学会
 全国データ集計事務局
- ・特定非営利活動法人(NPO)
 血液疾患臨床研究サポートセンター

臨床研究におけるデータの流れ



臨床研究の結果に影響を及ぼすデータエラー

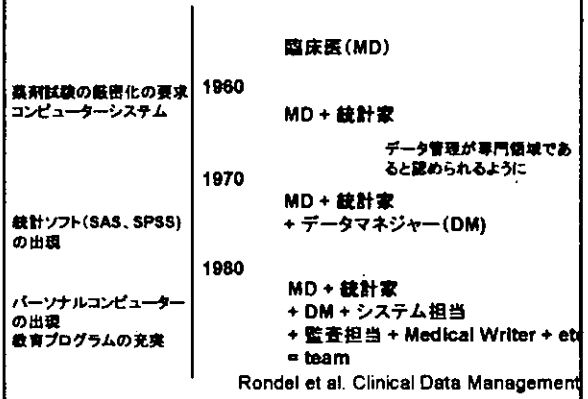


データマネジメントとは Clinical Data Management Research Data Management

研究(主に臨床研究、臨床試験)において、データエラーを低くコントロール(修正・予防)し、研究を科学的、論理的、効率的に行って正しい結論を導くための技術体系・科学

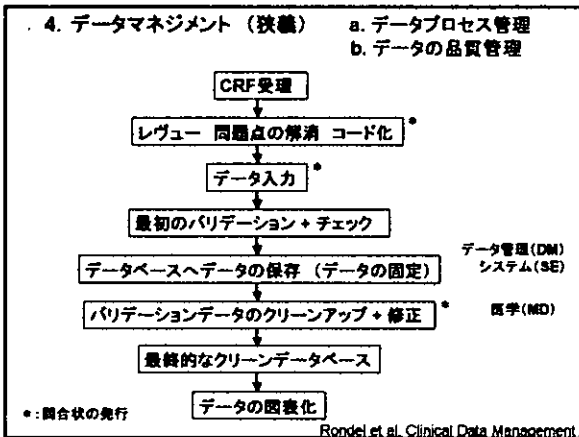
臨床研究における品質管理・品質保証の道具/方法論
 * 品質管理: すべてのプロセスのエラーを予防・修正
 * 品質保証: 処理が正しい/エラーが許容範囲であることを確認してデータと結論の正しさを保障する

米国におけるデータマネジメントの発展

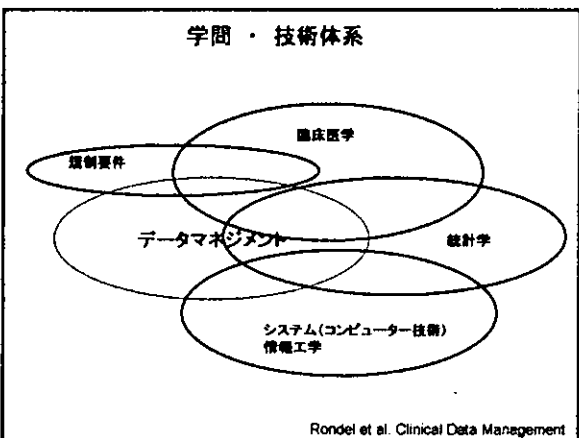


- ### データセンターの業務内容
1. 研究計画立案支援
 2. 患者の登録・割付 (ランダム割付)
 3. 進捗管理
 4. データマネジメント (狭義)
 - a. データプロセス管理
 - b. データの品質管理
 5. 有害事象対応およびレポート
 6. モニタリング
 7. 統計解析 (中間解析・最終解析)
 8. 学会発表、論文執筆の補助

1. 研究計画立案支援
 - a. 研究デザイン、症例数算定
生物統計学(統計家)
 - b. プロトコルレビューおよび記載
医学(MD)
* 米国ではMedical Writer
生物統計学(統計家)
 - c. 各種調査票の設計および作成
データ管理(データマネジャー(DM))
2. 患者の登録・割付 (ランダム割付)
生物統計学(統計家)
データ管理(DM)
3. 進捗管理
データ管理(DM)



5. 有害事象対応およびレポート
医学(MD)
データマネジメント(DM)
* 米国SWOGでは有害事象報告ヘルプデスクという部門
6. モニタリング
team
7. 統計解析 (中間解析・最終解析)
生物統計学(統計家)
8. 学会発表、論文執筆の補助
医学(MD)
生物統計学(統計家)



- ### まとめ
1. 臨床試験において、データエラーを最小限にし、研究を科学的、論理的、効率的に行って正しい結論を導くためにデータマネジメントは必須である。
 2. 臨床試験の立案時より、データセンターが関与することが重要である。
 3. データマネジメント業務には、複数の分野の専門知識および技術が必要である。
 4. 学会、班、大学レベルでデータマネジメント業務スタッフの育成を検討していくべきである。

活性化 CD4 リンパ球による DLI のための臨床試験体制の確立と 実施に関する研究

先端医療センター再生医療研究部

伊藤 仁也

要旨

DLI の問題点を解決すべく、固相化 CD3 抗体と IL-2 を用いた活性化した CD4 陽性細胞を造血細胞移植後の白血病の再発および、移植後免疫不全での難治性ウイルス感染症に対し、輸注する臨床研究を行ってきた。
白血病に対する活性化ドナー CD4 輸注の成績は評価可能な 28 例を解析し、寛解導入率は AML で 36%, ALL 36%, CML(AP) 33% であった。また III 度以上の GVHD は 16% であった。
活性化ドナー CD4 輸注療法の急性副作用としては、発熱、頭痛が 1 例づつ認められた。血小板減少症は 13%, 顆粒減少症は 9% であった。重篤な副作用として腹水の貯留、心膜炎、TMA、BO がそれぞれ 1 例づつ認められた。このような細胞治療の臨床試験体制を確立するためには、GMP に則った細胞の製造、品質管理に加え、GCP に則った臨床試験体制を構築し、evidence を確立していく必要がある。

1. これまでに活性化 CD4 輸注療法を行った症例の解析

1996 年 9 月から 2001 年 12 月までに造血細胞移植後に活性化リンパ球輸注を行った 59 例に対し、アンケート調査を行った。回収率は 95% であった。対象として、移植後再発白血病に対する DLI 療法としてが、28 例、生着不全、拒絶に対する細胞治療が 7 例、High risk malignancy の移植後再発予防としての DLI が 15 例の計 50 例を解析した。

	ANLL	ALL	CML
No. of patient	11	14	3
Male/Female	4/7	6/8	2/1
Median age	10Y (4-15)	7Y (1-38)	19Y (13-47)
Stage at DLI	MRD Overt	2 MRD 9 Overt Ex medullar 2	2 10 BO 1
HLA	7 5/8 5/8 4/8 3/8	8 2 2 2	2 0 1 0

	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

活性化ドナー CD4 輸注療法を行った患者内訳は ANLL 11 例、ALL 14 例、CML 3 例であり、HLA 一致例は 17 例、不一致例は 11 例であった。

CR 率は ANLL, ALL とも 36% で、CML は 33% であった。GVHD の重症度と GVL 効果には相関は認めなかった。

生存率は観察期間が短いため、詳細な解析はできないが、1 年生存率で比較すると ANLL で 20% ALL で 50% であった。感染症に対して 10 例の移植後難治性ウイルス感染症に対して活性化 CD4 輸注を行ない、CMV, Adeno virus において有効性が認められた。

2. 副作用

発熱	3/50	(6%)
頭痛	1/50	(2%)
関節痛	1/50	(2%)
血小板減少症 (Plt<20,000)	4/30	(13%)
好中球減少症 (Neutro<500)	3/32	(9%)
腹水	1/50	(2%)
心膜炎	1/50	(2%)
TMA	1/50	(2%)
BO	1/50	(2%)

GVHD		
Acute GVHD		
0	36/50	(72%)
I	3/50	(6%)
II	3/50	(6%)
III	6/50	(12%)
IV	2/50*	(4%)
Chronic GVHD		
None	34/46	(74%)
Limited	7/46	(15%)
Extensive	5/46	(11%)

* 1例はCD5 down modulationにより発症

重篤な副作用としては、腹水、心膜炎、がそれぞれ1例ずつ認められた。また TMA,BO が1例認められた。血小板減少は 13%,顆粒球減少は 9%にみとめられた。急性副作用としては、発熱が 6%頭痛が2%に認められたが、頻度は低かった。急性 GVHD は III 度以上の GVHD は 16%であり、慢性 GVHD の extensive type は 11%に認められた。HLA 一致度と GVHD の重症度には相関は認められなかった。

3. 細胞加工製剤を用いた臨床研究の確立

細胞加工を伴った細胞治療の臨床研究を行なうためには、製造施設の整備、GTP に則った培養法の開発、安全性を証明するための、品質管理法の確立、GCP に則った臨床プロトコルの作成が必要である。平成14年に薬事法が改正され、細胞治療に用いる細胞に関して自家の系、アロの系とも生物学的細胞治療製剤として定義づけが行なわれ、品質に関する品質管理法や治療の副作用モニタリング(ウイルス調査)、試料の保管義務や製造責任などが明記された。これに伴い、活性化 CD4 輸注療法のようなサイトカインを用いた細胞治療を行なうために、我々は cell processing center の整備、活性化 CD4 細胞製剤の品質管理法の開発を行なってきた。また、GTP に則った細胞加工を行なうためには、閉鎖系培養法、ウイルス検査法、無血清培養法などが必要不可欠であり、これらの開発も同時に行ない、より安全な細胞治療を行なうための基礎的検討も本研究班で行なう予定である。

細胞治療の治験申請に必要な項目
厚生省医薬発第908号 1999.7.30 「細胞・組織を利用した医療用具又は医薬品の品質及び安全性の確保について」
<ul style="list-style-type: none"> • 1. 起源又は発見の経緯、及び外国における使用状況 • 2. 製造方法の概要 • 3. 品質管理 • 4. 安全性 • 5. 前臨床試験(動物由来の同等品を用いた同種適応の系及びヒト由来の製品を用いた免疫寛容動物を利用する系) • 6. 前臨床試験等の内容の総括(リスク便益バランスに関する考察) • 7. 細胞・組織利用医療用具等の製造施設及び設備 • 8. 備考(外国の臨床試験例、国内治験例、診療費の提示など)

活性化リンパ球の品質・安全性試験
<ol style="list-style-type: none"> 1. 加工細胞の性質の変化を表現型、染色体検査等を行ない解析すること。 細胞の形態(光顕、電顕による観察)、表面抗原解析 染色体検査、FISH(癌化の有無) 2. 必要に応じて細胞・組織が産生する各種サイトカイン、成長因子等の整理活性物質の定量を行ない、生体内へ適応した時の影響に関して考察を行なうこと。 培養造血幹細胞は各種サイトカインを分泌することが知られており、24時間培養した際の培養上清サイトカインを定量 3. 製品の適応が患者等の正常な細胞又は組織に影響を与える可能性について検討、考察すること。 マウスを用いた体内動態・細胞分布の解析 ウイルス負荷試験等

活性化 CD4 輸注の臨床研究を行なうためには、これらの社会ニーズと evidence を証明しうる臨床試験の確立が不可欠であり、我々は本研究班の分担研究として、白血病に対する DLI、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予定である。

現在3基準書、1標準書(品質管理基準書、製造衛生管理基準書、製造管理基準書、製品標準書)に臨床プロトコルを加えた細胞治療のための基盤整備に取り組んでいる。

III-7 ウイルス抗原特異的 T 細胞による細胞療法

名古屋大学大学院医学研究科小児科学 工藤寿子、渡辺修大、小島勢二

目的

造血幹細胞移植後、臓器移植後における難治性ウイルス感染症における治療戦略として、臨床的に応用可能なウイルス特異的細胞障害性 T 細胞の分離、増殖の方法を確立する

MHCが提示する抗原ペプチドをT細胞が認識する。

SCT後のウイルス感染症に対する特異的CTLのモニタリング

EBV 1) Tetramer (2000年～)
2) IFN γ 産生 T-cell (1998年～)
3) ELISPOT

CMV 1) Tetramer (2002年～)

HLA typing : HLA-A*0201/2402

テトラマー法を使用したCTL増殖

T cell の増殖方法

25cm²入りのフラスコもしくは6well culture plateをOKT3(Janssen Kyowa:10 μ g/ml)で24時間固相化する。

磁気ビーズで分離したtetramer-positive cellsとCD4 T cellsを0.5~1 $\times 10^6$ /mlで培養する。
(medium : 10% FCS入りRPMI 1640 + IL-2 (シオノギ) 700U/ml)

2~3日毎に細胞数をカウントし細胞濃度を5~7 $\times 10^6$ /mlになるようにmediumを追加する。

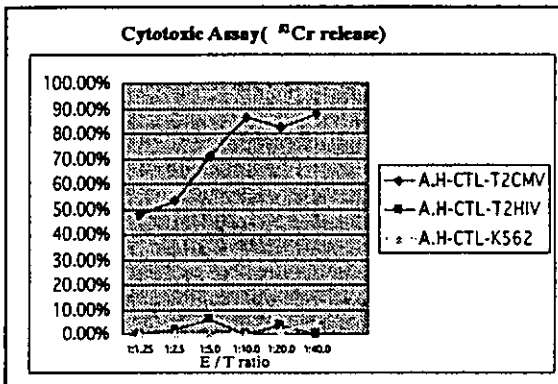
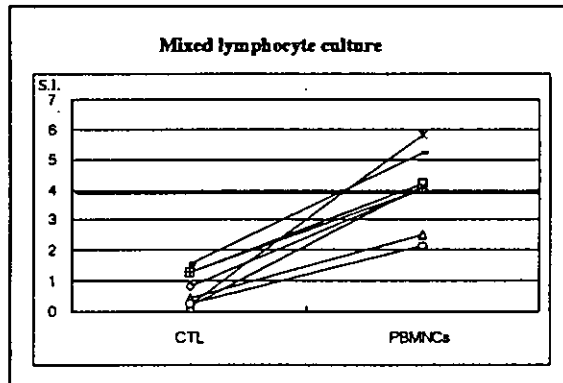
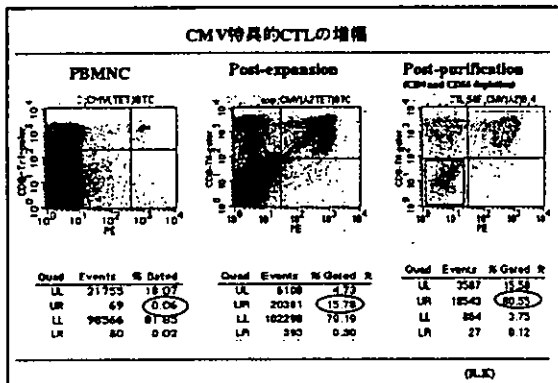
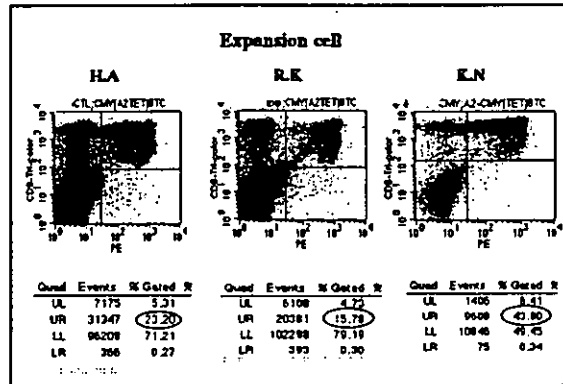
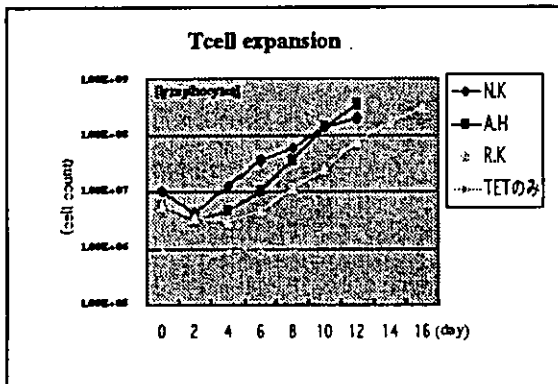
| Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y |

CMV特異的CTLの検出

Quad	Events	% Gated
UL	56204	24.69
UR	727	0.32
LL	171210	74.97
LR	34	0.02

Quad	Events	% Gated
UL	21735	18.07
UR	69	0.06
LL	98566	81.85
LR	30	0.02

Quad	Events	% Gated
UL	79634	33.49
UR	1394	0.59
LL	183300	65.82
LR	235	0.10



結語

- 1) HLA-テトラマー複合体を使用してウイルス特異的細胞障害性T細胞(CTL)の分離、増幅を行った。
- 2) 2週間前後にて臨床的に必要とされる10⁷/m²個のCTLを得る事ができた。
- 3) 増幅したCTLはallogeneic responseを認めず、ペプチドに特異的な細胞障害活性を示した。HLA拘束性にウイルス感染細胞を傷害するか否かは現在検討中である。
- 4) 今後、GMP基準を満たす培養条件で可能か検討する予定である。

1. HLA-A*2402 で提示されるマイナー抗原をコードする遺伝子の同定

血液系細胞に特異的なマイナー抗原は、HLA 一致同種移植後の造血器腫瘍に対する移植片対腫瘍(GVT)効果の標的抗原として有用と考えられ、Fred Hutchinson 癌研究所や Leiden 大学でこれを標的とした養子免疫療法の臨床試験が既に施行されている。これまでに我々は HLA-A*2402 および B*4403 に拘束されるマイナー抗原を認識する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) クローンの樹立^{1,2} およびリンケージ解析法によるマイナー抗原遺伝子 (*BCL2A1*) の同定³ を報告してきた。

2. Ex vivo におけるマイナー抗原特異的 CTL の誘導

HLA-A*2402 および B*4403 に拘束される *BCL2A1* 由来のマイナー抗原をそれぞれ ACC-1、ACC-2 と命名した。このうち ACC-1 ペプチド (DYLQYVLQI) を用いて、ACC-1 不適合移植を受けた患者の末梢血から ACC-1 特異的 CTL を容易に誘導することが出来た。抗原陰性のドナーや健常人の末梢血を用いて同様な試みを行ったが成功していない。以上より、*in vivo* で感作を受けた T リンパ球より CTL を誘導する方が確実であることがわかった。

3. ACC-1 特異的テトラマーによる移植後末梢血中の CTL の動態の解析

ACC-1 不適合移植を受けた 1 名の患者の末梢血を経時的に ACC-1 特異的 HLA-A24 テトラマーで追跡した。移植後半年の時点でも特異的 CTL が存在し、*in vitro* でのペプチド刺激により増幅が可能であった。

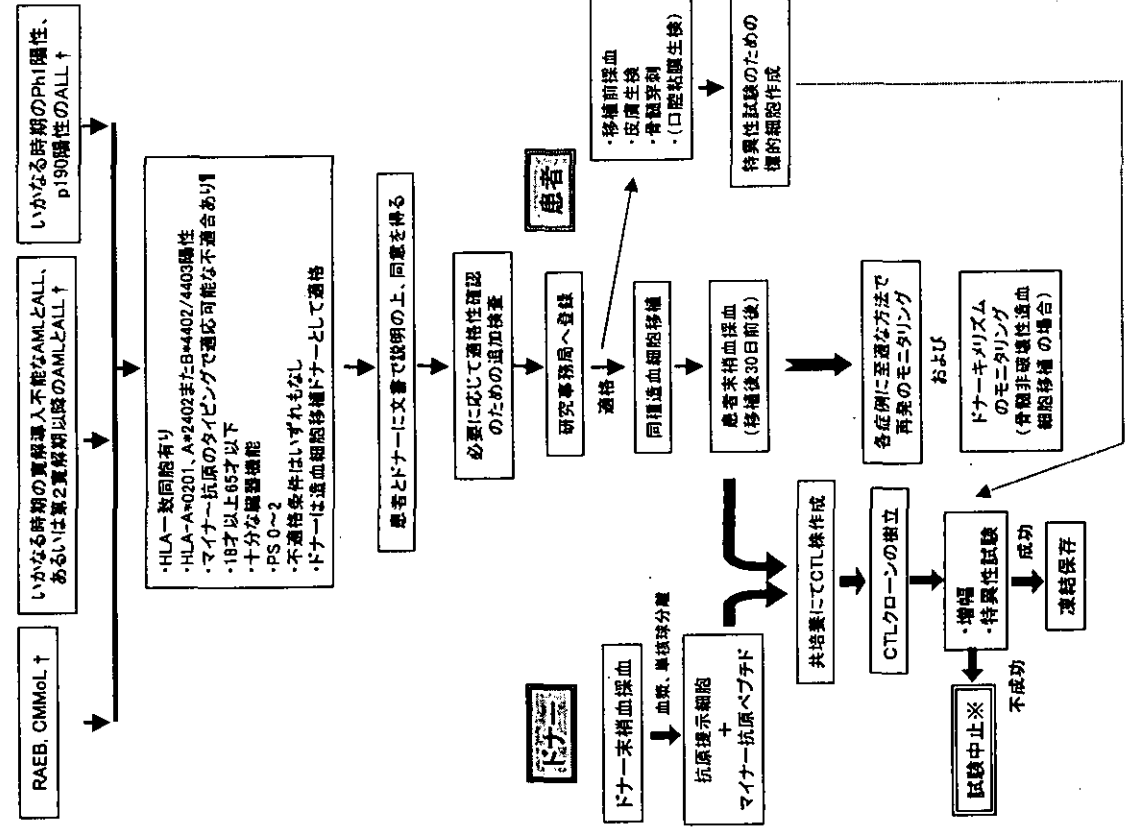
4. 移植後再発白血病に対する養子免疫療法

今回同定したマイナー抗原遺伝子 *BCL2A1* は血液系細胞のみに発現し、移植後末梢血を用いた *in vitro* での特異的 CTL の樹立も容易である。また造血幹細胞移植と組織適合抗原部会で示したとおり、ACC-1 の不適合は造血器腫瘍に対する同種移植後において急性 GVHD 等の合併症を増加させず、むしろ生存率を改善している傾向が認められており、養子免疫療法へ応用が可能と考える。

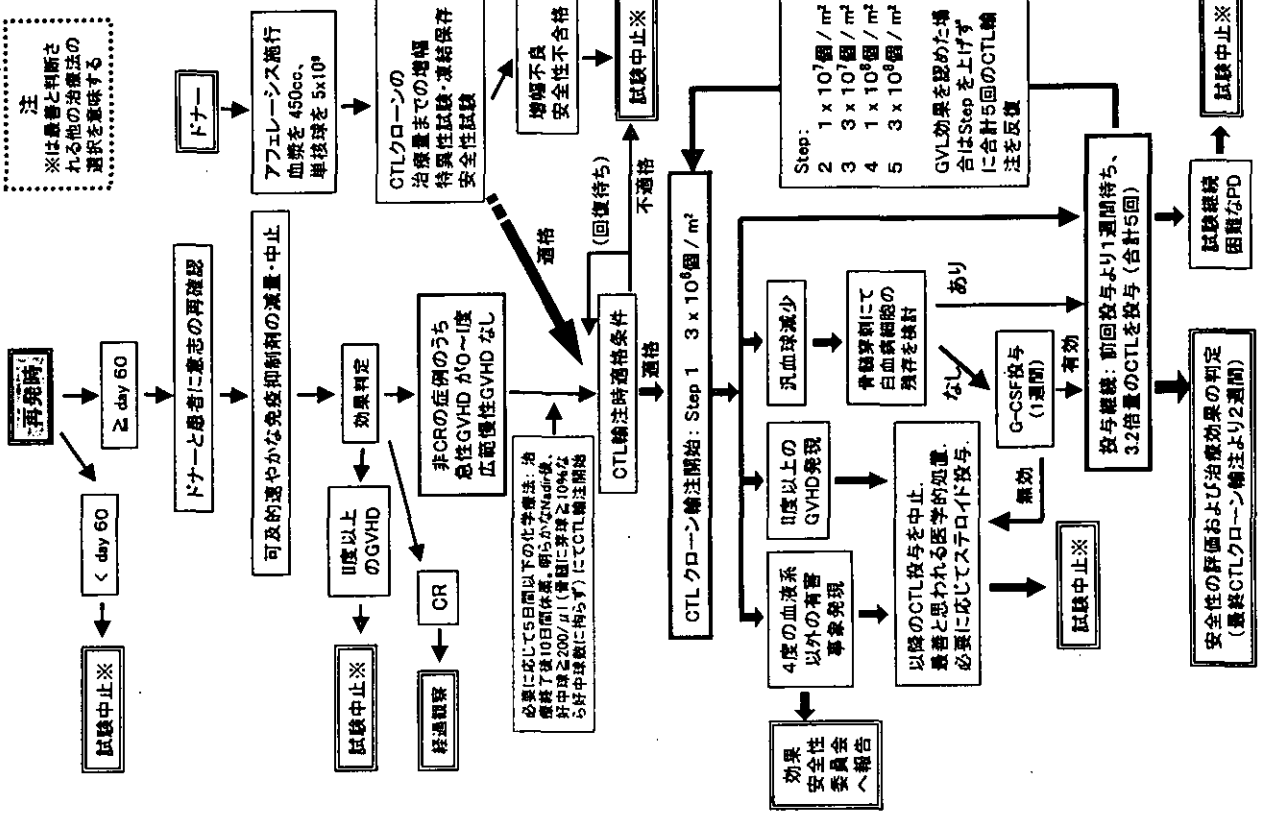
既に ACC-1 および HA-1 を標的抗原とした臨床試験のプロトコールは当センターの倫理委員会で承認済みであり、適格症例が見つかり次第、試験を開始する予定である。臨床試験のフローチャートを裏面に添付した。

5. 文献

1. Akatsuka Y, et al. *Tissue Antigens*. 59:502-511, 2002.
2. Akatsuka Y, et al. *Transplantation*. 74:1773-1780, 2002.
3. Akatsuka Y, Nishida T, et al. *J Exp Med*. 197:1489-1500, 2003.



(注) †は、移植の対象となる患者の診断名を示す。
 ‡はHLA研究所にて行う。
 ※は最善と判断される他の治療法の選択を意味する



樹状細胞を用いたペプチド特異的 T 細胞の増幅とヘルパー抗原の効果
 北脇年雄、門脇 則光 京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学

【目的】有効で持続的な CD8 T 細胞反応を誘導するためには、CD8 T 細胞活性化の初期に CD4 T 細胞からのヘルプが存在することが重要な鍵を握っていることが示されている。今回、我々は *in vitro* で単球由来 DC を用いて腫瘍抗原由来のペプチドに特異的な CD8 T 細胞反応を誘導する際、ヘルパー抗原を同時に DC に提示させて CD4 T 細胞を活性化させることが、CD8 T 細胞反応にどのように影響するかを検討したので報告する。

【方法】Tetanus toxoid (TT) で免疫した健常人ドナー末梢血から分離した単球を GM-CSF、IL-4 の存在下に 5~6 日間培養して作成した未成熟 DC に、ヘルパー抗原として TT を加えて 24 時間貪食させた後、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、PGE₂ を 24 時間加えて成熟させ、WT1 由来 A24 拘束性の改変ペプチド (CYTWNQMNL) を 2 時間パルスした。この DC を同一ドナーの T 細胞と 2 ラウンド共培養した後、さらにペプチドをパルスした C1R-A2402 を APC として T 細胞を刺激し、HLA テトラマーおよび IFN- γ ELISPOT アッセイにてペプチド特異的 CD8 T 細胞の頻度および反応性を検討した。

【結果】TT を 10 μ g/ml、1 μ g/ml の濃度で加えた DC、および TT を加えなかった DC で比較したところ(図 1)、TT 1 μ g/ml の DC で刺激した T 細胞が 3 回刺激後のテトラマー陽性細胞の頻度が最も高く、ヘルパー抗原がペプチド特異的 T 細胞の増幅を促進する効果が認められた。しかし、TT 10 μ g/ml の DC で刺激した T 細胞では、逆にテトラマー陽性細胞が認められなくなり、過剰量のヘルパー抗原によるペプチド特異的 T 細胞反応の抑制が認められた。CD8 T 細胞を分離して行った IFN- γ ELISPOT アッセイ(図 2)では、TT を加えた DC で刺激した T 細胞で TT 特異的な CD8 T 細胞の増幅が認められ、高濃度のヘルパー抗原がペプチド特異的 CD8 T 細胞反応を抑制するメカニズムは、MHC クラス I 上における WT1 と TT ペプチドの競合、あるいは、APC 上における WT1 特異的 T 細胞と TT 特異的 T 細胞の競合によるものであることが示唆された。

図 1 WT-1 tetramer staining

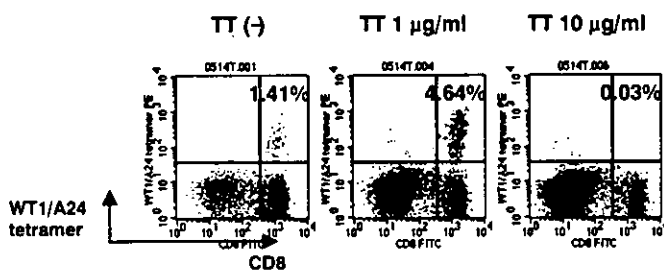
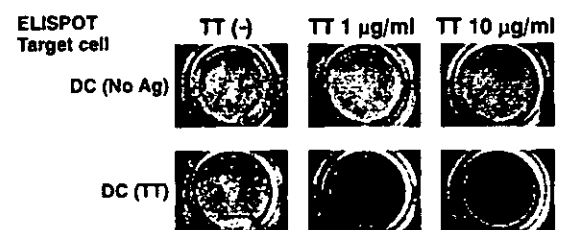


図 2 IFN- γ ELISPOT assay: CD8 T cell



【結論】*In vitro* でペプチド特異的 CD8 T 細胞を効率よく増幅するために、ヘルパー抗原を用いることは有用であると考えられる。ヘルパー抗原によりペプチド特異的 CD8 T 細胞反応が抑制されることもあり、至適条件について今後の検討が必要である。