

移植を施行されていた。糖尿病については、26例で現在糖尿病と診断されており、13例でインスリン自己注射を導入されていた。

D. 考察

移植後長期生存例において、臓器障害や二次癌・代謝異常など様々な疾患が問題になっており、QOLの低下の原因になっている可能性が示唆された。東京都立駒込病院では、造血幹細胞移植後の患者の約4割は、院外（主に紹介元）に通院しており、毎年主治医にフォローアップの資料を送付して、現状や結果を収集している。主治医より返事が得られない場合には、患者本人に郵送して病状や健康上の問題点・採血結果も可能な範囲で送付してもらっている。しかし、2008年度のフォローアップデータの調査における回収率は、主治医への調査では82%、患者本人への調査では66%であった。今回検討した移植後長期生存例に限ると約2割で十分な追跡調査が出来ていない。また回収されたデータや、院内でフォローアップしている症例に関しても、血圧や代謝異常項

目などについて、定期的にフォローされておらず、データの欠損が目立った。今後長期生存例のQOLに関わる因子の抽出を行う上で、施設内はもちろんのこと、施設間でも統一したフォローアップ体制を構築する必要があると考えられた。

E. 結論

移植後長期生存例において臓器障害や二次癌・代謝異常など様々な疾患が問題となっている。これから疾患の予防・早期発見・増悪予防のための十分なフォローアップ体制を構築し、フォローアップを依頼している多くの施設との連携を更に密にして、移植後成績の更なる向上に勤める必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第31回 日本造血細胞移植学会総会

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

分担研究報告書

血栓性微小血管障害の診断と治療の確立に関する研究 —消化管 TMA の病態解析ならびに診断、治療に関する後方視的研究—

研究分担者 原 雅道 愛媛県立中央病院 副院長

研究要旨：血栓性微小血管障害の診断と治療の確立のため、これまで明らかにされていなかった消化管TMAの病態を解明する。対象は移植後TMA、急性GVHD II度以上と診断した症例および移植後、腹痛、下痢、消化管出血を呈した症例で、下部消化管内視鏡検査にて組織生検を行った症例とする。臨床、検査、病理各所見から総合的に検討して病態の層別化を図る。その結果得られた種々の因子から消化管TMAの病態を明らかにする。さらに消化器病変を呈する移植症例の病態別ステロイドの使用方法等、治療方針を確立する。

A. 研究目的

造血幹細胞移植に伴う血栓性微小血管障害（TMA）は最小動脈の血管内皮障害を主体とし、急性GVHD、感染症、前処置などともなう治療関連毒性などが複雑に絡み合って発症する移植後合併症であり、治療に苦慮することが多い。近年 TMA の病型のうち下痢などの腹部症状を呈する消化管 TMA の存在が注目されているが、消化管 GVHD との鑑別が難しく、診断基準も明らかになっていない。

本研究は消化管 TMA の病態を臨床病理学的に解明することを目的とする。

B. 研究方法

参加各施設にて2002年1月から2007年12月までの6年間に同種造血幹細胞移植を施行した患者で、移植後 TMA と診断した症例、急性 GVHD II度以上の症例および移植後、腹痛、下痢、消化管出血を呈した症例で、下部消化管内視鏡検査にて組織生検を行った症例を対象とする。

生検材料を用いて、3名の病理医師のもとで中央診断を行う。生検材料からGVHD、TMA、CMV感染症診断に使われている病理学的項目を検討し、診断、治療に寄与する病理組織学的項目を抽出する。Pilot studyとして100例を対象に病理組織学的項目を抽出する。そしてその項目を用いて

Validation studyとして別な100例を診断する。一方臨床データも同時に集積して、臨床所見、検査所見、病理所見から総合的に検討し、病態の層別化を図る。その結果得られた種々の因子から、消化管 TMA の病態を明らかにする。さらに消化器病変を呈する移植症例の病態別ステロイドの使用方法等、治療方針を確立する。

本研究は疫学研究に関する倫理指針（平成19年文科省、厚労省告示）に則って行う。各施設の倫理委員会審査を行い、研究対象者には同意を得ることを原則とするが、同意が得られない場合は、研究の意義、目的、方法、研究機関名等について情報公開を行う。また検体、資料は厳格に匿名化を行い、厳重に管理する。

C. 研究結果

進行中であり結果は出ていない。

D. 考察

消化管 TMA の病態を、病理組織学的に検討した研究はこれまで報告はなく、本研究の成果が期待される。

E. 結論

未

F. 健康危篤情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

「眼慢性移植片対宿主病(GVHD)に関する NIH 診断基準と重症度スコアの validation」

研究分担者 岡本 真一郎 慶應義塾大学医学部血液内科 准教授

研究要旨：2005年に提案された NIH Consensus Criteria for the Diagnosis and Severity Grading of Chronic GVHD の眼慢性 GVHD に関する臨床的有用性の検証話されていない。本研究は 2001 年から 2007 年までの間に慶應義塾大学移植チームで同種幹細胞移植を受けた成人患者(年齢 16 歳以上)で、移植後 100 日を超えて無再発生存した 83 症例を対象に、NIH、Classic Dry Eye(CDE)、Dry Eyes Workshop(DEWS) 各々の診断基準と重症度スコアを算定し比較を行うとともに、眼 GVHD の治療反応性との相関を検討した。その結果、他の診断基準と比較して、NIH 診断基準では軽症例に慢性 GVHD 以外のドライアイが含まれる可能性と、大多数の GVHD 症例が中等症に分類されることが確認された。さらに、NIH 重症度スコアで軽症と中等症と診断された症例の治療効果と眼 GVHD の予後に関しては明らかな有意差は認められなかった。この結果より、今後の新規治療法に関する臨床研究の対象症例の選定に NIH 診断基準を役立てるためには、BUT などの機能的診断を加えた中等症の基準を再検討するとともに、その prospective な validation を行うことの重要性が示唆された。

A. 研究目的

慢性 GVHD は移植後後期の移植関連死亡および生活の質(QOL)低下の主要な要因として、その成功を妨げている。特に、眼慢性 GVHD は強皮症様皮膚病変、閉塞性再気管支炎等とともに移植後の QOL の低下に関与する主要な病態であるばかりでなく、角膜潰瘍から失明に至る重症例も報告されている。その克服が急務と考えられる移植後合併症である。

その病態が着実に明らかとなり、その病態に立脚した様々な予防/治療法が開発され、制御が得られつつある急性 GVHD とは異なり、慢性 GVHD の予防/治療法の開発は立ち遅れている。その病態が今なお十分に解明されていないことがその主な理由であるが、一方でその診断基準/重症度分類、そして治療効果判定基準に関するコンセンサスが得られていないことによって、様々な新規治療法に関する臨床研究の成果の客観的評価が困難であることも問題視されてきた。

これまで慢性 GVHD の診断にはシアトル移植チームが提唱した診断基準と重症度分類が広く用いら

れてきたが、少数例の経験に基づいた基準で、実際の臨床症例に合致しない点が多いことが指摘されてきた。そこで、NIH から新たに慢性 GVHD の診断と重症度に関する基準 (NIH Consensus Criteria for the Diagnosis and Severity Grading of Chronic GVHD) が提唱された。そして、これまでに 5 つの移植施設が個々の症例を用いて NIH 基準の validation を行ってきたが一定の見解は得られていない。さらに、民族遺伝的背景が異なるアジア系の患者における validation の報告はなく、眼の慢性 GVHD についての検討は全くなされていない。

そこで我々は NIH の眼慢性 GVHD に関する診断基準と重症度スコアの臨床的有用性を後方視的に検討した。

B. 研究方法

2001 年から 2007 年までの間に慶應義塾大学移植チームで初回の同種幹細胞移植を受けた成人患者(年齢 16 歳以上)で (1) 100% ドナーキメラを

達成し (2) 移植後 100 日を超えて無再発生存し (3) 移植前にドライアイを認めなかった症例で、同種造血幹細胞移植直前から定期的に眼科で経過観察され、後方視的に NIH 診断基準 (Filipovich et al. Biol Blood Marrow Transplant 2005;11:945-956.)、Classic Dry Eye 診断基準 (CDE)、そして、Dry Eyes Workshop 診断基準 (Behrens A, Doyle JJ, Stem L, et al. Dysfunctional tear syndrome. A Delphi approach to treatment recommendations. Cornea 2006; 25: 90-7) (DEWS) の診断基準に基づいてドライアイの再診断と重症度スコアの算定に必要なデータセットが整っている 83 例を対象とした。

NIH 診断基準では、new ocular sicca (Schirmer \leq 5 mm of both eyes) または KCS by slit-lamp examination with mean values of 6-10 mm on the Schirmer test に加えて、眼以外の臓器に慢性 GVHD の distinctive な manifestations を認めた場合に眼 GVHD と診断した。NIH 重症度スコアは表 1 に従って算定した。CDE の診断基準では (1) ドライアイによる眼症状を認める (2) Schirmer 試験が <6 mm and/or BUT <6 sec (3) Rose bengal score 3 \leq and/or Lisamin Green score 3 \leq and/or Fluorescein score 3 \leq のすべてを満たす場合をドライアイと診断した。さらにドライアイと診断された症例は、鼻刺激 Schirmer 試験の結果によって軽症 (Schirmer が 10 mm $<$) と重症 (Schirmer が <11 mm) に分類した。

治療は CDE 系症例に対しては人口涙液の点眼のみを行い、重症例に対しては自己血清点眼、punctal plug、免疫抑制剤の点眼、medical use contact lenses、amniotic membrane transplantation などの治療を、その時点での臨床試験プロトコールに基づいて選択した。

今回の解析は chart review による後方視的検討として、すべての移植患者からの包括同意の範囲と考え IRB の承認は必要としないと判断した。

C. 研究結果

NIH 診断基準では 57 例 (68.7%) が眼慢性 GVHD

と診断されたが、CDE の診断基準および DEWS の診断基準に基づいて診断されたドライアイの割合は各々 51 例 (61.4%)、53 例 (63.9%) で NIH 基準を用いた場合を下回った。

次に、各診断基準に基づく重症度について検討を行った。今回は解析対象が比較的少数例であるので症例数が少ないので、DEWS 重症度スコアに関しては、1+2 と 3+4 の 2 群に分けて解析をおこなった。

結果を表 2 に示す。NIH の重症度分類ではドライアイの約 81% が中等症に分類され、軽症および重症に分類される症例の割合が著しく少ない結果となった。一方、CDE と DEWS の重症度分類では、軽症 (DEWS のスコア 1 と 2) 重症 (DEWS のスコア 3 と 4) にドライアイの 2/3 と 1/3 が分類され、CDE と DEWS の重症度スコア間には良好な相関が認められた。

次に、各診断基準に基づく重症度と治療反応性について検討を行った。結果を表 3 に示した。いずれの診断基準においても、重症度が増加するとともに、治療によってドライアイが改善する症例の割合は低下し増悪する症例の割合が増加した。NIH 診断基準の重症例では、増悪を認めた症例が 80% であるのに対し、改善を示した症例が 10% のみで、他の診断基準と比較して極めて重症例が選択されていることが示唆された。また、NIH 基準の軽症 GVHD には CED あるいは DEWS 診断基準では早期診断できなかった rapidly progressing dry eyes の症例が含まれていた。

D. 考察

今回の検討によって、眼慢性 GVHD に関する NIH 診断基準と重症度スコア診断のこれまでの診断基準の優劣がある程度明らかにされた。

NIH 基準では、Schirmer 試験が 6-10 mm であっても他臓器に慢性 GVHD が存在する場合は GVHD に伴うドライアイと診断することとなる。この場合、慢性 GVHD 以外の原因によるドライアイを含む可能性 (over diagnosis) が問題となる。一方、CDE の診断基準は false negative をできるだけ排除す

るように設けられた厳しい診断基準であり、この点では NIH 基準に勝るといえる。しかし一方で、CDE 基準では、rapidly progressive dry eye のごく初期を除外してしまう可能性が問題点としてあげられる。今回の検討では、CDE の診断基準で軽症と診断されたが、NIH の診断基準では中等症と診断された症例が 21 例あり、このうち 5 例が重症化している。

NIH の診断基準では、中等症と分類される症例が多数例を占めるという問題点が明らかにされた。この主な理由は、一日に使用する点眼薬の必要量である。ドライアイ症例は軽症であっても 1 日に数回の点眼をすることが多く、結果として中等症と分類されることとなる。今回の検討でも、NIH 重症度分類の軽症と中等症の間で治療効果に有意な差は認められていない。今後、新規治療の臨床試験の対象症例を選択する視点からは、適切なスコアリングとは言えないと考える。今後は、BUT などの涙液分泌機能検査などを複数併用して客観的に重症度を規定することが重要と考える。

NIH 重症度スコアで重症と診断された症例は極めて治療抵抗性であり、この点では重症の評価は妥当と考えられる。しかし、このような重症例では涙腺の障害あるいは線維化が不可逆的となっていることが多いので、臨床試験の対象からの除外基準として有用であるという点で評価できると考える。

E. 結論

今後の新規治療法に関する臨床研究の対象症例の選定に NIH 診断基準を役立てるためには、BUT

などの機能的診断を加えた中等症の基準を再検討するとともに、その prospective な validation を行うことの重要性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ban Y, Ogawa Y, Goto E, Uchino M, Terauchi N, Seki M, Nakaya M, Saiki M, Mori T, Okamoto S, Matsumoto Y, Dogru M, Shimazaki J, Tsubota K.: Tear function and lipid layer alterations in dry eye patients with chronic graft-versus-host disease. Eye 2009 Jan23(1): 202-208.

2. 学会発表

- 1) Aisa Y, Mori T, Okamoto S: Chronic GVHD -Recent progress and controversy- The validation of NIH Consensus ; 第 31 回日本造血細胞移植学会総会、2009 年 2 月 5 日—6 日、札幌。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

Diagnosis of Eye Chronic GVHD

New ocular sicca (Schirmer \leq 5 mm of both eyes)

or

- KCS by slit-lamp examination with mean values of

+

Distinctive manifestations in at least 1 other organ

Organ Scoring of Eye Chronic GVHD

Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Mild dry eye symptoms not affecting ADL (requiring eyedrops \leq 3 \times per day) OR asymptomatic signs of keratoconjunctivitis sicca	<input type="checkbox"/> Moderate dry eye symptoms partially affecting ADL (requiring drops $>$ 3 \times per day or punctal plugs), WITHOUT vision impairment	<input type="checkbox"/> Severe dry eye symptoms significantly affecting ADL (special eyewear to relieve pain) OR unable to work because of ocular symptoms OR loss of vision caused by keratoconjunctivitis sicca

NIH scoring		Classic dry eye		DEWS	
non dry eye	0	non dry eye	0	non dry eye	0
mild	1	mild dry eye	1	mild	1
moderate	2	severe dry eye	2	moderate	2
severe	3			severe	3
				severe, disable	4

Severity Grading of Eye Chronic GVHD —According to the different criteria—

	NIH	Classic dry eye	DEWS
0	26 (31.3%)*	32 (38.6%)	30 (36.1%)
1	9 (10.8%)	33 (39.6%)	12 (14.5%)
2	43 (51.8%)	18 (21.7%)	24 (29.0%)
3	5 (6.0%)		9 (10.8%)
4			8 (9.6%)
Total(N)	83	83	83

*N(%)

Eye GVHD Grading and Treatment Outcome

Grading		Unchanged	Worse	Improved
NIH	0	100%	0	0
	1	67	11	22
	2	30	29	41
	3	10	80	10
Classic	0	88	6	6
	1	41	18	41
	2	17	50	22
DEWS	0	93	0	7
	1 - 2	42	19	39
	3 - 4	11	56	28

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

分担研究報告書

『移植片宿主病の診断に関するガイドラインの作成と二次治療も含めた効率的な予防および治療法の確立に関する研究』

研究分担者 豊嶋 崇徳 九州大学病院 准教授

研究要旨：新たな移植片対宿主病の診断・治療に関するガイドラインを作成した。今後の臨床研究の基盤となっていくものと考えられる。

A. 研究目的

造血幹細胞移植の最大の合併症である移植片対宿主病（GVHD）の国際的な診断基準が改定されたことに伴い、わが国の診断基準を改定し、より効率的な予防、治療法開発を行う基盤整備とする。

B. 研究方法

欧米より提唱された、GVHDの新たな診断基準を翻訳し、わが国での医療の現状と合致するかどうかを専門家の意見をヒヤリングして、検証した。また動物モデルを用いて、末梢性寛容機構の破綻がGVHDの発症に及ぼす影響を検討した。

<倫理面への配慮>

動物実験は九州大学の動物実験施設の承認を受けた。

C. 研究結果

従来わが国での診断ガイドラインが上梓されて9年経過しており、国際的なコンセンサスと合致しない点が多々みられ、専門家のヒヤリングを行い、ほぼ欧米の基準と合致したものを作成した。また、動物実験からは末梢性制御機構の破綻がGVHDの発症に関与することを示唆するデータがえられつつある。

D. 考察

わが国のGVHDの診断基準は作成から年月が経過したこともあり、国際基準と合致しない点が見

られた。これを国際基準と合致させていくことに、医療現場にも大きな異論はなかった。

E. 結論

新たな診断・治療ガイドラインを作成した。臨床研究や臨床試験への展開への展開が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamasaki S, Heike Y, Mori S, Fukuda T, Maruyama D, Kato R, Usui E, Koido K, Kim S, Tanosaki R, Tobinai K, Teshima T, Takaue Y: Infectious complications in chronic graft-versus-host disease: a retrospective study of 145 recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with reduced- and conventional-intensity conditioning regimens. *Transplant Infect Dis* 10(4): 252-259, 2008
- 2) Eto M, Kamiryo Y, Takeuchi A, Hirano M, Tatsugami K, Harada M, Kiyoshima K, Hamaguchi M, Teshima T, Tsuneyoshi M, Yoshikai Y: Posttransplant administration of cyclophosphamide and donor lymphocyte infusion induces potent antitumor immunity to solid tumor. *Clin Cancer Res* 14(9):2833-40, 2008.
- 3) Kim S-W, Matsuo K, Fukuda T, Hara M, Matsue K, Taniguchi S, Eto T, Tanimoto M, Wake A,

- Hatanaka K, Nakao S, Ishida Y, Harada M, Utsunomiya A, Imamura M, Kanda Y, Sunami K, Kawano F, Takaue Y, Teshima T: Reduced-intensity unrelated donor Bone Marrow Transplant for hematologic malignancies. *Int J Hematol* 88(3): 324-330, 2008.
- 4) Sumida Y, Nakamura K, Kanayama K, Akiho H, Teshima T, Takayanagi R: Preparation of functionally preserved CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells from leukapheresis products from ulcerative colitis patients, which are applicable to regulatory T cell-transfer therapy. *Cytotherapy* 10(7): 698-710, 2008.
- 5) Orita Y, Tsujigiwa H, Nishizaki K, Teshima T, Yoshinobu J, Orita Y, Takeuchi A, Takeda Y, Nagatsuka H, Nagai N: The engraftment of transplanted bone marrow-derived cells into the inner ear. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 266(1): 59-63, 2009.
- 6) Hamaguchi M, Eto M, Kamiryo Y, Takeuchi A, Hirano M, Tatsugami K, Teshima T, Harada M, Yoshikai Y, Naito S: Allogeneic cell therapy from immunized donors with tumor antigen peptide enhances the antitumor effect after cyclophosphamide-using non-myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer Sci* 100(1): 138-143, 2009.
2. 学会発表
- 1) Kadowaki M, Aoyama K, Koyama M, Sakoda Y, Takeda K, Liu C, Akashi K, Tanimoto M, Teshima T: T cell Toll-like receptors play a critical role in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia. 50th Annual Meeting of The American Society of Hematology. Dec 6-9, 2008, San Francisco, USA.
- 2) Takashima S, Aoyama K, Koyama M, Hashimoto D, Oshima T, Tomizuka K, Akashi K, Teshima T: Protection of the intestinal epithelium from conditioning with R-spondin1 ameliorates graft-versus-host disease. 50th Annual Meeting of The American Society of Hematology. Dec 6-9, 2008, San Francisco, USA.
- 3) Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Nagafuji K, Teshima T, Akashi K: Predominant reconstitution of B lymphoid precursors (Hematogone) following unrelated cords blood stem cell transplantation. 50th Annual Meeting of The American Society of Hematology. Dec 6-9, 2008, San Francisco, USA.
- 4) Sugiyama H, Maeda Y, Nishimori H, Kobayashi K, Nishie-Kataoka M, Teshima T, Tanimoto M: Cyclosporine, but not mTOR inhibitors, hampers the reconstitution of bone marrow-derived Tregs in long-term complete donor chimeras. 50th Annual Meeting of The American Society of Hematology. Dec 6-9, 2008, San Francisco, USA.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

分担研究報告書

「造血幹細胞移植患者に対する CMV ワクチンの開発の現状と問題点」

研究分担者 浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部

研究要旨：骨髄移植における CMV 感染に関しては、移植後 1 ヶ月以降に発症し、肺、消化管に好発し、ガンシクロビル等の抗ウイルス剤の投与が必要になる。感染症のコントロールが困難な場合があるうえに、治療薬剤の副作用もからみ、患者予後を左右する大きな問題である。本研究課題では CMV に対するワクチンの開発の現状と問題点を明らかにする。

A. 研究目的

我々健康人の多くは既に幼少期に CMV ウイルスに不顕性感染しており、特に大きな病態を引き起こすことなく生涯にわたり個体内に潜伏感染した状態にある。ところが、免疫能低下時 CMV は間質性肺炎、網膜炎、腸炎等の感染症を引き起こすことが知られている。とくに移植中期に発症しやすく、ガンシクロビルといった抗ウイルス剤が使用可能となっている今日に至っても、とくに CMV 間質性肺炎は造血幹細胞移植後に合併するウイルス感染の中で最も致命的であり、その感染対策は重要である。現在 CMV に対するワクチンの開発が世界中ですすめられており、これらの現状と問題点を明らかにする。

B. 研究方法

欧米のワクチンの審査について、平成 20 年 9 月、英国 EMEA およびドイツ Paul-Ehrlich 研究所を訪問し、新規ワクチン開発における臨床試験の実態および販売製造承認のシステムについて意見交換を行った。

C. 研究結果

(1) CMV ワクチンの開発状況

CMV ワクチンに関する世界における開発状況は図 1 のとおりである。この中で、ワクチン名 ALVAC-CMV は現在第 2 相臨床試験に入っており、

安全性・有効性の評価の検討がなされている。本臨床試験は骨髄提供前にドナーにワクチン (ALVAC-CMV) 接種を行った後に、NIH の骨髄移植プロトコールに従い移植を行い、患者の CMV 感染および症状の評価を行うものである。これらの試みは移植後中後期における重篤な感染症に対するワクチンによる効果的予防法の確立のうえでも期待がかかる。また、CMV タンパク質 pp65、gB、IE1 に対する DNA を用いた DNA ワクチンの開発も進んでいる。米国における第 2 相臨床試験では、DNA ワクチンがレシピエントのみに接種された場合にも、CMV 抗原に反応する T 細胞の誘導が図られ、有効であることが中間報告された。これらの CMV ワクチンの開発は移植後中後期における重篤な CMV 感染症に対する効果的予防法として期待がかかる。

(2) ヨーロッパにおける新規ワクチンの臨床試験

ワクチンの開発において臨床試験は重要なプロセスである。ドイツにおいては第一相の臨床試験に 100-150 万ユーロのコストがかかる。ドイツ政府はアカデミックグループ発の有望なワクチン開発については、積極的に臨床試験をサポートするシステムをとっている。しかし、引き続き政府のサポートのもとで、第二相試験以降に進むかどうかは厳密な評価の上で決定されている。また政府が GMP ファシリティーを提供し、莫大なワクチン

開発のためのコストを軽減するシステムもあるがまだ余り稼働していない。臨床試験実施のための審査については、ヨーロッパではEU各国共通のシステムを2004年より採用している。すなわち臨床試験の申請は各国のNRAと“Leading”倫理委員会の両方で独立して行われる。両者の承認が得られない場合臨床試験はできない。この過程において、各国のNRAは共通の指令やガイドラインをミニマムの要求事項としているが、同じ申請書であっても、国による判断が異なることがある。この場合には、国間の協議が必要となる。ドイツにおいては、PEI内には臨床試験担当部門があり、審査の過程で2回の試験実施者とのやり取りを行い、平均73日で審査結果を示している。この間、PEI内の専門部門からのアドバイスを積極的に受け入れている。申請件数は年々増えているが、メーカーのものは81%、医師主導のものも73%がpositiveと判定されている。

(3) ヨーロッパにおける製造販売承認

ワクチンの製造販売申請の審査はバイオテクノロジーを用いた等の新規製法によるワクチン製剤や、今後ヨーロッパ全体で市販される可能性が見込まれる製剤に関しては、EMAにおけるCentralized Procedureがとられている。申請書を正、副のRappoteurで独立して意見をとりまとめ、CHMPの審査チームが最後に承認の可否の決定および報告を行う。審査の決定は法的に210日と設定しており、審査の遅延に対する問題はおこっていない。日本においては、市販申請審査決定の直前に承認前検査としてBatch releaseに関する試験項目に関して検討を行っているが、ヨーロッパではNRAで承認審査を始める前にメーカーとNCLで規格、Batch releaseに関する試験項目について協議される事もある。またCentralized Procedure以外にも2カ国以上の国間で行うDecentralized Procedure、またはMutual Procedure、一国内で行うNational Procedureの方法がある。開発されたワクチン製剤の難易性、および見込まれる市場の汎用性を考慮にいたったヨ

ロッパのシステムは規制当局およびメーカー側にもメリットのある手法といえる。新しいワクチンの審査については、既存のガイダンスに従ってワクチンの有効性や安全性に関するエンデポイントや基準値の妥当性を検討する。また審査には多くの専門家の意見を参考にしている。

D. 考察

(1) CMV ワクチンによるCMV再活性化の予防は造血幹細胞移植において、新たな方法として期待が持てる。とくに海外において開発が進められているDNAワクチンにはCTL効果が報告されており、第2相の臨床試験においても有効性が認められている。またDNAワクチン以外にもベクターを用いた組換えワクチンの開発もすすめられており、臨床試験の試験結果が待たれる。

(2) こうした新規ワクチンの開発および臨床試験において、ヨーロッパにおいては、国および規制当局がワクチン開発をサポートするシステムが整備されている。また、国毎の製造販売承認のみならず、ヨーロッパ全体で承認を与える方法など、新規ワクチンの導入にむけたシステムの整備が進んでいる。

E. 結論

造血幹細胞移植患者に対する感染予防に対するCMVワクチンなど、特殊な状況で使用が望まれるワクチン開発が世界で進められている。日本においても、海外で承認される新規ワクチンに対しても迅速な対応が望まれる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1. CMVワクチンの臨床試験状況

Vaccine/Format	Antigens	Company	Development
Towne CMV/live virus	Whole virus	MBA, GSK?	No efficacy for prev of maternal infection
CMV gB/recomb. subunit	Env glycoprotein B	Sanofi-Pasteur	Phase II efficacy trials underway
Chimeric CMV/live virus	Whole virus	Medimmune	Initial phase I completed
ALVAC/ vectored, avian pox virus	pp65, gB	Sanofi-Pasteur	Phase II efficacy trials underway
DNA/ plasmid	pp65, gB, IE1	Vical	Phase II efficacy trials underway
VEE, alphavirus/ vectored	pp65, gB, IE1	AlphaVax	Phase I trial completed

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

分担研究報告書

「同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有およびドナーとレシピエントのQOLを視野に入れた成績の向上に関する研究」班

「造血細胞移植後の微生物モニタリング:高感度多項目迅速低価格微生物
検出システムの開発と臨床研究」

研究分担者 森尾 友宏 東京医科歯科大学 大学院 発生発達病態学分野
研究協力者 清水 則夫 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 ウイルス治療学

研究要旨:造血細胞移植後における日和見感染症の早期発見、早期治療に向けて、新規微生物検出システムの開発を行った。今までの192名1375検体の解析からは、感染症疑い検体の15%以上で複数以上のウイルスが検出されること、尿検体でBKVの検出が増加していること、移植前にHHV6が検出された症例では、移植後に再度検出され、発熱などの一因となっている可能性があることなどが明らかになった。本年度の研究により、GBV, HEV, TTV, Metapneumovirus, Norovirus, Enterovirus, HPV, アスペルギルス、カンジダ、ニューモシスチス、トリコスポロン、クリプトスポリジウム、肺炎桿菌、緑膿菌、非定型好酸菌群なども解析可能な体制になった。

A. 研究目的

造血細胞移植後の感染症は直接的に予後に関わるのみならず、拒絶やGVHDなどに対しても悪影響を与え、移植の結果に大きな影響を及ぼす。この研究では、今までに開発した17種類のウイルスを簡便に、高感度に、かつ経済的に計測するシステムを用いて、移植後の微生物モニタリングシステムを確立すると共に、測定可能な微生物を増やし、また新しい検出システムを開発することを目的としている。

B. 研究方法

1) 造血細胞移植後の血液、尿、便、咽頭ぬぐい液、生検材料などから核酸を抽出し、capillary PCRにてmultiplex PCRを行い、さらに標識プローブとハイブリダイゼーションさせて、melting curve analysisにてウイルスを同定した。

2) 陽性検体では、realtime PCR法にて定量検査を行った。検査を行ったウイルスはHSV1, HSV2, VZV, EBV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8, HBV, Parvovirus B19, BK virus, JC virusであり、そ

の他検体に応じてAdenovirus, Norovirusなどを追加して解析した。

4) 今後解析が有用と思われる微生物種については、新しいprimer, probeを設定して、パイロット的に解析を開始した。

5) 次世代微生物検出システム開発の検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、通常の採血や検体採取以外の手技は伴わないが、データ収集や解析に当たってはインフォームドコンセントの取得が必要である。

C. 研究結果

1) 造血細胞移植後微生物検査の解析

今までに蓄積された造血細胞移植後微生物検査からいくつかのポイントを抽出した。患者背景は白血病105名、免疫不全症33名に続き、固形腫瘍や慢性活動性EBV感染症が多く、移植の形式としては非血縁者間臍帯血移植(59症例)、非血縁者間骨髓移植(55症例)、血縁者間骨髓移植(34例)

の順となっていた。患者総数は 192 名で、検体総数は 0375 検体、コントロールとして 241 検体を用いた。以下に結果の概略を提示する。

1. 血液検査では EBV, CMV, HHV6, BKV の検出率が高い。
2. ウイルス陽性検体では >15% の割合で他のウイルスが検出される。
3. 尿検体では BKV, AdV (BKV > AdV) の検出頻度が高い。
4. BKV 膀胱炎では 1×10^5 / mL 以上 and/or 血液で陽性の場合に原因ウイルスと判断される。
5. 便のウイルス PCR は AdV, NRV 以外解釈は難しく、CMV 腸炎も確定診断根拠とするのは困難である。
6. HHV6 は移植前からのフォローにより早期に治療介入できる可能性がある。
7. ウイルス感染症以外を含めた複数感染症はさらに多く、体系的なアプローチが望まれる。

2) 検査可能微生物種類の拡大

研究の結果、以下の微生物について検討が可能になった。

1. ウイルス : HSV1, 2, VZV, CMV, EBV, HHV-6, -7, -8, BKV, JCV, ParvoB19, HIV-1, -2, HTLV-1, -2, HAV, HBV, HCV, HEV, HGV, TTV, Metapneumovirus, Norovirus, Enterovirus (Enterovirus, Echovirus, Coxsackie virus, Poliovirus) Adenovirus, 1 ~ 48, HPV16, 18
 2. 細菌、真菌、原虫
トキソプラズマ、トキソカラ、クラミジア、バルトネラ、結核、梅毒 (+Multiplex PCR)
アスペルギルス、カンジダ、ニューモシスチス、トリコスポロンアサヒ、クリプトスポリジウム、百日咳、肺炎桿菌、緑膿菌、非定型好酸菌群
 3. 網羅的細菌検査
16S rRNA gene 定量 PCR 及び定 (シーケンス解析)
- 3) 次世代微生物検出システムの開発

96 well plate に probe や試薬を固相化し、検体と DNA polymerase などをアプライして、10 種類以上のウイルスを半定量するシステムの開発にあたった。

HSV1	HSV2	VZV	EBV	CMV	HHV6	HHV7	HHV8	BKV	JCV	Parvo	GAPDH
HSV1	HSV2	VZV	EBV	CMV	HHV6	HHV7	HHV8	BKV	JCV	Parvo	GAPDH
HSV1	HSV2	VZV	EBV	CMV	HHV6	HHV7	HHV8	BKV	JCV	Parvo	GAPDH
HSV1	HSV2	VZV	EBV	CMV	HHV6	HHV7	HHV8	BKV	JCV	Parvo	GAPDH
HSV1	HSV2	VZV	EBV	CMV	HHV6	HHV7	HHV8	BKV	JCV	Parvo	GAPDH
HSV1	HSV2	VZV	EBV	CMV	HHV6	HHV7	HHV8	BKV	JCV	Parvo	GAPDH
HSV1	HSV2	VZV	EBV	CMV	HHV6	HHV7	HHV8	BKV	JCV	Parvo	GAPDH
HSV1	HSV2	VZV	EBV	CMV	HHV6	HHV7	HHV8	BKV	JCV	Parvo	GAPDH

第二世代 PCR 半定量系 : 96well plate 配置例

また機器の小型化やマイクロ粒子担体を用いて PCR 法を用いずに微生物を検出するシステムの開発も行っている。

D. 考察

今までの多項目高感度迅速微生物検査法はほぼ完成されているが、今後測定可能微生物の追加、より簡便なシステムの開発、システムのバリデーション、技術移転など、取り組むべき課題が多い。

本研究班の中で、臨床的疑問に根ざした検体解析による臨床研究、探索的臨床研究を行い、検査法については、in house で行えることを目標としながら、東京医科歯科大学にて受託検査できる体制を整備することを目指したいと考えている。

E. 結論

多項目高感度迅速微生物検査法は有用性の高い検査方法であり、今後の絞った解析におき、有用な情報を抽出できる可能性がある。

また、検査項目の拡大や、次世代システムの開発により、さらに使用しやすい系が確立することが期待できる。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto S, Sugita S, Sugamoto Y, Shimizu N, Morio T, Mochizuki M. Quantitative PCR for the detection of genomic DNA of Epstein-Barr virus in ocular fluids of patients with uveitis. [Journal Article] Japanese Journal of Ophthalmology. 52(6):463-7, 2008
 - 2) Honda M, Takagi M, Chessa L, Morio T, Mizuatni S. Rapid diagnosis of ataxia-telangiectasia by flow cytometric monitoring of DNA damage-dependent ATM phosphorylation. *Leukemia*. 2008 Jul 17. [Epub ahead of print]
 - 3) Kido S, Sugita S, Horie S, Miyana M, Miyata K, Shimizu N, Morio T, Mochizuki M. Association of varicella-zoster virus (VZV) load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpette. *Br J Ophthalmol*. 92(4):505-8, 2008
 - 4) Suzuki K, Tsugawa K, Oki E, Morio T, Ito E, Tanaka H. Vesical varices and telangiectasias in a patient with ataxia telangiectasia. *Ped. Nephrol*. 23: 1005-1008, 2008.
 - 5) Morio T, Kim H, Ku, Artemis, and Ataxia-Telangiectasia-Mutated: Signaling Networks in DNA Damage. *Int J Biochem Cell Biol*. 40:598-603, 2008.
 - 6) Shinohara M, Koga T, Okamoto K, Sakaguchi S, Arai K, Yasuda H, Takai T, Kodama T, Morio T, Geha RS, Kitamura D, Kurosaki T, Ellmeier W, Takayanagi H. Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. *Cell*, 132: 794-806, 2008.
 - 7) Takahashi N, Morio T. Common variable immunodeficiency. *Japanese Journal of Clinical Immunology* 31(1):9-16, 2008
 - 8) Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Mizukami M, Morio T, Sugamoto Y, Mochizuki M. Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol*. 92:928-32, 2008.
 - 9) Hasegawa D, Fukushima M, Hosokawa Y, Takeda H, Kawasaki K, Mizukami T, Nunoi H, Ochiai H, Morio T, Kosaka Y. Successful treatment of chronic granulomatous disease with fludarabine-based reduced-intensity conditioning and unrelated bone marrow transplantation. *Int J Hematol*. 87:88-90, 2008.
2. 学会発表
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)
 - 1) 森尾友宏、高橋尚美、水谷修紀 ICOS 欠損症における T 細胞機能異常、第 2 回日本免疫不全症研究会、2009 年 1 月 30 日、東京
 - 2) Tomohiro Morio Ex vivo expansion of CD4 T-cells from cryopreserved cord blood and its application in adaptive immunotherapy post cord blood transplant. 第 35 回日本低温医学会総会、2008 年 11 月 21 日、東京
 - 3) 森尾友宏、造血幹細胞移植後の細胞治療の現状と展望、第 3 回新潟細胞再生療法フォーラム、2008 年 10 月 24 日、新潟
 - 4) 森尾友宏、造血細胞移植後 ex vivo 増幅 CD4T 細胞輸注療法、第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 10 日-12 日、京都
 - 5) 森尾友宏、増殖リンパ球による細胞療法、第 15 回ヘルペス感染症フォーラム、2008 年 8 月 22 日-23 日、札幌
 - 6) 森尾友宏、梶原道子、清水則夫、伊藤仁也、藤原成悦、大隅一興、関根暉彬、造血幹細胞移植後ウイルス感染症に対する活性化 CD4DLI 療法、第 56 回日本輸血・細胞治療学会、2008 年 4 月 26 日、福岡
 - 7) Morio T, Watanabe F, Takahashi N, Sato M, Sato R, Takagi M, Imadome K, Miyawaki T, Domenico Delia, Nakamura K, Richard Gatti, Mizutani S. Ataxia-Telangiectasia in Japan: Phenotypic variations in affected siblings with Ataxia-Telangiectasia. Ataxia telangiectasia workshop 2008, Ohtsu, April 22-25, 2008.
 - 8) Morio T Ataxia telangiectasia: Involment of ATM in immunodeficiency and leukemogenesis. Symposium on Recent Advances in Cell Function and Defense Mechanisim, Seoul, April 18, 2008.
 - 9) Morio T. Immunodeficiencies with impaired DNA damage response. Recent Advances in DNA Damage Response, Seoul, April 18, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

APPLICATION OF SYNOVIUM-DERIVED MESENCHYMAL
STEM CELLS (MSCs) FOR CARTILAGE OR MENISCUS
REGENERATION (米国国際特許出願中 YCT-1301)

出願人：関矢一郎、発明者：宗田大、森尾友宏、
清水則夫、黒岩保幸

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

分担研究報告書

白血病関連抗原を標的とした移植片対白血病効果増強の試み

研究分担者 中尾 眞二 金沢大学医薬保健学域医学系細胞移植学 教授

研究要旨：白血病細胞は免疫反応の標的となるいくつかの白血病関連抗原(leukemia-associated antigens; LAAs)を発現しているが、LAAsに特異的な細胞傷害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte: CTL)は患者の体内では排除されてしまうため、白血病患者自身の体内では有効な抗白血病免疫は起こらない。しかし、同種造血幹細胞移植(allo-SCT)後には、ドナー由来のT細胞がこのLAAsを認識して移植片対白血病(graft versus leukemia: GvL)効果を発揮する可能性がある。HLA-A24分子に提示されるcyclin-dependent kinase (CDK)2蛋白由来ペプチドは、白血病細胞が過剰発現している自己抗原の中から同定されたLAAsである。これまで我々は、HLA一致allo-SCT前に微小残存病変(minimal residual disease: MRD)を有し移植後長期に寛解を維持しているHLA-A24陽性白血病患者では、移植後末梢血中にドナー由来のCDK2ペプチド特異的CTLが検出されることを明らかにしてきた。今回は、①移植後CDK2ペプチド特異的CTLが検出される機序として、移植前に残存する白血病細胞由来樹状細胞(leukemic dendritic cell: LDC)がドナーのナイーブCD8T細胞を刺激してCDK2ペプチド特異的CTLを誘導すること、②LDCは抑制性シグナル分子の一つであるGITR (Glucocorticoid-induced TNFR-related protein) のリガンド(GITRL)を発現しており、GITR/GITRL結合がナイーブCD8T細胞からCDK2ペプチド特異的CTLの誘導を抑制していることを明らかにした。これらの所見は、移植後に抗GITR抗体を投与することによって効果的にGvL効果を誘導できる可能性を示唆している。

A. 研究目的

移植前に残存するMRDが移植後CDK2ペプチド特異的CTLを誘導する機序を明らかにするため、CDK2タンパクを過剰発現しているLDCがCDK2ペプチドの添加なしに健常者ナイーブCD8T細胞からCDK2ペプチド特異的CTLを誘導し得るか否かを検討した。また、LDCが発現するGITRLとT細胞上のGITRとの結合がCDK2ペプチド特異的CTLの誘導に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

LDCの検出、純化

18例の白血病細胞患者(CML-CP 4例, AML-M0 1例, AML-M1 1例, AML-M2 5例, AML-M4 1例, AML-M5 1例, Ph⁺AML 1例, Ph⁺ALL 2例, CMMoL 2例)の診断時末梢血と5例の健常者末梢血中の骨髓系樹状

細胞(myeloid DC: mDC)をフローサイトメトリーで検出した。mDCはCD14, CD16陰性, CD85k, CD33陽性細胞とした。CD1cマイクロビーズを用いて白血病細胞患者の末梢血単核細胞(peripheral blood mononuclear cells: PBMCs)からmDCを純化後、FISH (fluorescence in situ hybridization)法を用いてmDCが白血病細胞由来(LDC)であることを確認した。

LDCによるCDK2ペプチド特異的CTLの誘導

HLA-A24陽性白血病細胞患者のPBMCsから純化後GM-CSF, IL-4, TNF α で成熟分化させたLDCを抗原提示細胞として、HLA-A24陽性健常者および診断時の患者末梢血ナイーブCD8T細胞を14日間繰り返し刺激して培養し、2種類のCDK2由来ペプチド(CDK2₁₅₈, CDK2₁₇₈)特異的CTLを誘導した。培

養 T 細胞中の CDK2 ペプチド特異的 CTL を、フローサイトメトリーを用いた peptide/HLA pentamer (CDK2₁₅₈/A24 pentamer, CDK2₁₇₈/A24 pentamer) assay, 及び IFN γ secretion assay で検出した。

GITR/GITRL 結合阻害による CDK2 ペプチド特異的 CTL の誘導

LDC 上の GITRL の発現をフローサイトメトリーで確認した。LDC 刺激による CDK2 ペプチド特異的 CTL の誘導に LDC 上の GITRL が与える影響を検討するために、LDC 上の GITRL と CD8⁺T 細胞上の GITR との結合を阻害する抗 GITR 抗体の添加による CDK2 ペプチド特異的 CTL 誘導の変化を peptide/HLA pentamer assay で評価した。

C. 研究結果

白血病患者の末梢血中には LDC が高頻度に検出される

18 例中 4 例 (CML-CP, AML-M4, AML-M5, Ph⁺AML 1 例ずつ) の白血病患者の末梢血中には健常者に比べて多くの mDC が検出された [健常者 全白血球数の 0.01-0.6%, 白血病患者 2.13-5.44%]. CML-CP と Ph⁺AML 例の PBMCs から純化した mDC は bcr/abl 融合遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いた FISH 法で Ph 染色体が陽性であり、白血病細胞由来 (LDC) であることが確認された。

LDC は健常者ナイーブ CD8⁺T 細胞を刺激して CDK2 ペプチド特異的 CTL を誘導する

HLA-A24 陽性 AML-M4 患者の PBMCs から純化後に TNF α 刺激によって成熟分化させた LDC との共培養前後で、同じ患者由来 CD8⁺ T 細胞中には pentamer 陽性細胞が検出されなかったが、HLA-A24 陽性健常者 CD8⁺ T 細胞中には共培養後 CDK2₁₅₈/A24 pentamer, CDK2₁₇₈/A24 pentamer 陽性細胞がそれぞれ 2.3%, 5.7% 検出された。健常者ナイーブ CD8⁺ T 細胞から誘導された CTL は、ペプチドを添加していない HLA-A2402 遺伝子導入 T2 細胞 (A24-T2) に反応して 0.5% のみが IFN γ を産

生したのに対し、CDK2₁₅₈, CDK2₁₇₈ を添加した A24-T2 にはそれぞれ 2.3%, 1.6% が反応して IFN γ を産生したことから、CTL の抗原特異性が確認された。

LDC 上に発現している GITRL と CD8⁺T 細胞上の GITR との結合を阻害することによって、CDK2 ペプチド特異的 CTL の誘導が増強される

成熟分化した AML-M4 由来 LDC には CD83, CD40 とともに GITRL が検出された。GITRL 陽性 LDC で HLA-A24 陽性健常者ナイーブ CD8⁺T 細胞を刺激する際に抗 GITR 抗体を添加しなかった場合に刺激後検出された CDK2₁₅₈/A24 pentamer 陽性細胞が 0.37%, CDK2₁₇₈/A24 pentamer 陽性細胞が 0.45% であったのに対し、抗 GITR 抗体を添加した場合陽性細胞はそれぞれ 1.17%, 1.64% に増加したことから、GITR-GITRL 結合阻害によって CDK2 ペプチド特異的 CTL の誘導が増強されることが確認された。一方健常者の単球由来 DC 上には GITRL は検出されず、ペプチドをパルスした GITRL 陰性単球由来 DC を抗原提示細胞として HLA-A24 陽性健常者ナイーブ CD8⁺T 細胞を刺激して CDK2 ペプチド特異的 CTL を誘導する際にも、抗 GITR 抗体添加による CTL 誘導増強効果は認められなかった (CDK2₁₅₈/A24 pentamer 0.8% vs 0.77%, CDK2₁₇₈/A24 pentamer 0.64% vs 0.76%)。

D. 考察

allo-SCT 後の GvL 効果を担っているのは主にドナー由来の T 細胞と考えられている。GvL 効果の標的抗原を同定し allo-SCT 後に抗原特異的な免疫を誘導することができれば、GvHD のリスクを増加させずに白血病細胞を特異的に排除することが可能である。LAA は白血病細胞が HLA 上に提示している白血病反応性 CTL の標的抗原であるが、その多くは組織の分化抗原など腫瘍細胞が過剰発現している自己抗原である。自己抗原由来 LAA に特異的な免疫を誘導するためには、自己抗原に対する末梢性トレランスを破綻させなければならないが、白血病細胞は HLA や co-receptor の発現を低下させたり、LAA 特異的 CTL の機能的結合性