

他の作業から隔離されていることが理想的である。しかし、適切な清掃や管理手続が的確に実施され、材料や製品の残留や混同がないことが保証されていれば、同じ区域や作業室が他の試験製品の製造あるいは検査を含む多目的に利用することは可能である。この場合、作業区域の設計や配置は材料や器具などが整然と配置されており、順序立てて取り扱うことができ、取り間違いの防止、以前に製造された製品などの混入、あるいは作業員や環境からの汚染防止に配慮されていることが推奨される。

研究用INDの製造のために使用される試薬や成分材料には適切にラベルを貼り、取り違えや誤った使用を避けられる方法で整然と整理していれば、研究のために使用されるものと同じ区域内でも安全に保管できるであろう⁸。ただし、一つの試薬や成分材料はどの時点においても、特定の目的（すなわち研究のみ、あるいは製造のみ）のためだけに使用することが推奨される。

ii) 生物学的手法およびバイオテクノロジーによって製造された製品

生物学的手法、およびバイオテクノロジーによって製造された研究用IND（病原性微生物、芽胞形成微生物、遺伝子導入動植物、生ウイルスワクチンと遺伝子

治療ベクターから作られる製品を含む）は、特に封じ込めを考慮する必要がある。

製造工程を管理することは、生物学および生物工学的製品の正しい組成と安全性を確保するためにきわめて重要である。したがって、第I相臨床試験を開始する際には、同じ特性を有する研究用INDを再現性よく製造するために、その製造工程と適切な検査方法が文書化され適切に管理されることがきわめて重要である。また、各製造過程で採取され保管されている異なるロットのサンプルを後で比較分析することにより、重要な情報を得ることができるであろう。

安全性に関連する機能（ウイルスの除去、ウイルスや毒素の弱毒化、低温殺菌など）を備えた装置が意図されたとおりに稼働していることを保証するために、適切な品質管理（設備や装置のパリテーション）が行われていることが必要である。ウイルス量、生物負荷量、細菌毒素の解毒、ウイルスの除去もしくは不活化、および抗生物質や化学薬品などの除去のような安全性を目的とした検査を生産時に行い、また感染症病原体に関する適切な試験手順を確立しておく必要がある。

製品の製造が行われる環境を評価する際、それ以前に行われた検査や製造工程の残留物（バクテリア、ウイルス、マイコプラズマなど）を含む感染性病原体による汚染をどの程度受けやすいかを評価することは特に重要である。

iii) 多品目を製造する施設

⁸ 研究用INDの製造を通常の実験室や研究室で行っても良いと言う意味ではない。試薬や成分材料の保管に関する記述であり、実際には、同じ区域内と言っても研究用IND専用の保管庫が必要である。できれば、研究用IND専用の保管区域を設けることが望ましい。

多品目を製造する施設は感染性病原体による汚染を予防するためのクリーニング方法の手順と、クリーニング後の評価検査手順を確立しておくことが推奨される。可能な限り専用の設備とディスプレイの物品（チューブ等）を使用することが望ましい。また、多品目を製造するエリアでは、交差汚染を防ぐための手順を確立し、またウイルスやベクターの加工が行われた場合などは、特に共有された設備機器や作業表面から、以前に製造されていた製品の残留物が取り除かれていることを証明することが求められる。

iv) 遺伝子治療および細胞治療製剤

研究用の遺伝子治療製剤や細胞治療製剤の製造様式は多様かつ特殊であるため、製造者は付加的な管理あるいは特化した管理の妥当性を考慮すべきである。細胞治療研究や遺伝子治療の治験に用いる製品は Phase 1 GMP ガイダンスに従い製造されることが推奨されるが、必ずしもそれらに従うことができない場合も予想される。例えば、ある研究用 IND（細胞）では、入手可能な原材料の量が限られているため、最終細胞製剤の一部をサンプルとして保存が出来ないかもしれない。その様な時には、その製造方法を採用した根拠が研究用 IND（細胞）に関する記録として保管されることが推奨される。

たとえば、CGMP ではバリデーションと呼ばれる項目がきわめて重要であるが、その中に製造手順が意図した通りに実施可能か検証する performance

qualification(PQ)がある。これに従えば、睥島移植の場合、ドナーから提供された睥臓組織を用いて練習することが義務づけられるわけであるが、倫理上許されないのは自明である。

10) 複数ロットの製造

Phase 1 GMP ガイダンスの対象となる生物学的手法あるいはバイオテクノロジーによって製造された製品は、第 I 相臨床試験において一人の被験者につき 1 ロットしか製造できないケースがある（治療用ワクチン、細胞治療、遺伝子治療の場合など）。この場合には、複数ロットの生産によって初めて製造情報や検査情報などが蓄積されるであろう。また、適切な管理手順をもち、それを遵守することによって比較可能な研究用 IND（細胞）の製造が可能になる。一方、同じ研究用 IND で複数ロットを生産する場合には、製造責任者が定期的に製造工程を自己点検し記録を残すことが推奨される。この自己点検は、日常的な製造作業を休止して、製造された研究用 IND の検査成績から得られたデータを含めて、作業手順、工程、および種々の情報を評価することが望ましい。この自己点検結果に基づいて必要な修正や変更を行うことで、作業手順や製造作業を管理することが可能となる。

11) 無菌製品および無菌処理製剤

研究用 IND（細胞）の無菌化には、特別な予防措置を講じることが推奨される。無菌処理の管理には十二分な注意を払う

べきであり、以下の要件に関して考慮することが推奨される。

- ・ 層流式無菌ワークステーション（清浄度 クラス 100）で無菌操作を行う⁹。
- ・ 適宜、無菌ワークステーション全体を消毒する。
- ・ 層流式無菌ワークステーションの中の物品が、気流を妨げていないことを確認する。
- ・ 層流式フードでの作業中には頻繁に手袋を消毒するか、または取り替える。
- ・ 試験管ラックおよび殺菌された注射器やフィルターの包装などの未殺菌物品の表面は、それらを層流フード内に置く前に消毒する。
- ・ 適切な条件の下で殺菌の段階を経た後に、薬剤もしくは成分材料の操作を行う。
- ・ 成分材料や中間材料、最終製品の無菌性を維持するために、すべての手順を文書化し、それを遵守する。
- ・ 無菌検査は、検査物品が検査自体による干渉を受けないことが明確にされている必要がある。
- ・ 微生物やエンドトキシンによる汚染防止を目的として設計された成分材料を用いて無菌操作を行い、微生物汚染を防止する。
- ・ 無菌操作を行う作業者に無菌操作の教育訓練を行う。
- ・ 滅菌作業に用いられる設備は使用に

適したものでなければならない。例えば、定期的に保守点検および校正が行われ、保守管理記録が保管されている。

- ・ 無菌成分材料やディスポーザブルの装置（フィルター、バック、容器など）を使用する際には、滅菌保証分析書、または滅菌方法が検証（バリデート）されていることを示す証明書を作成するか、あるいは保管しておく。
- ・ 品質管理部門または品質管理者による最終製品の出荷承認の際に、無菌的手順や予防措置に従ったことを示す製造記録が適切に審査されていることを確認する。
- ・ 最終製品の出荷承認は、無菌検査による条件に適した結果が確認されるまで行わない。しかし、放射性の研究用 IND や研究用 IND（細胞）のように貯蔵寿命の短い製品は、無菌検査の結果が出る前に他のそれに相当する類似の検査の結果（例えば、バブルポイントフィルター完全性試験による除菌判定、研究用 IND（細胞）のグラム染色または他の迅速な微生物検出検査における陰性とエンドトキシン判定試験における陰性）に基づいて、出荷承認しなければならない場合もある。無菌テストや他の関連検査の結果が陽性だった場合には、汚染の原因を確定するための調査を行い、原因が同定された場合には、それに続く是正措置がとられることが推奨される。

D. 結論

2006 年 1 月に米国 FDA から”

⁹ ワークステーションとは、安全キャビネット（米国ではすべて安全キャビネットであり、いわゆるクリーンベンチは細胞プロセッシングでは基本的に用いられていない）、または、リア・ア・アイソレータ・システムなどのことを指す。

Guidance for Industry. INDs - approaches to Complying with CGMP During Phase 1”として草案が発表され、われわれは「産業界のためのガイダンス、INDs—第I相試験におけるCGMPに準拠したアプローチ」と題した邦訳を試み、「臨床評価」(第33巻3号、2006年)に公表した。しかし、2006年5月にこのガイダンス草案の前提となるGMPに関する米国連邦行政規則の改正が取り下げになった。ただし、この草案自体が取り下げになったわけではなく、未決と言う状況におかれたままになっていた。上記の第33巻3号にも脚注として記載したが(626頁)、当時の米国連邦行政規則の改正は、米国における新薬・新規治療法開発の原則であるIND申請を、あるレベルの臨床試験ではFDAの監視のもとに免除しようとする内容であった。それまでFDAがトランスレショナルリサーチ(TR)を含むすべての臨床試験にIND申請をさせ、臨床試験にもちいる新薬の品質や安全性を保証していたシステムが崩れるのではないかと懸念されたわけである。

その後FDAはこの草案に対してパブリックコメントを聴取するだけでなく、TRから先の検証的試験や実用化への道が米国においてもなかなか繋がらない問題点を反省し、Critical Path Researchとして非臨床研究から製品の上市にいたるシステムのどこが問題であるのかを問いかけていたようである。

そして、2008年7月に”Guidance for Industry. CGMP Phase 1 Investigational

Drugs”として最終版が発表された。最終版の文章構成自体は大きく訂正されているが、全体をつらぬくコンセプトは前回の草案と酷似している。すなわち、IND申請の重要性を堅持しつつも、stepwise approachの重要性を再確認したものになっている。加えて、草案とは異なり、いわゆる錠剤などの研究新薬だけでなく生物製剤についても適応することが必要であると明記し、ワクチン製品や細胞治療や再生治療にもちいる治療用ヒト細胞についても言及している。また、治療用ヒト細胞も含む新薬INDの製造環境の重要性を強調し、とくにQC(Quality Control)と細菌やウイルスによる交差汚染に関してあらためて注意を喚起した内容となっている。

基礎研究の成果をTRとして行う際に、開発段階に応じた新薬の製造管理を行うべきではあるが、第I相試験にもちいる新薬INDをアカデミアなどにおいて製造するとき、従来の規制にしばられるのではなく、いかにして品質と安全性を保証しつつ、かつスムーズにTRあるいは早期臨床試験がアカデミアにおいて実施できるようになるかと言うところが問題なのであり、これからもこのガイダンスは改訂されてゆくであろう。その時に一番大切なのは、TRにかかわる研究者および臨床研究医、そして行政サイドの新規医療開発に対する深い洞察と高い見識、それに確固とした倫理観ではなかろうか。

E. 健康危険情報

特記事項なし

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Shimura, K., Ashihara, E., Shimazaki, C., Matsunaga, S., Taniguchi, K., Uchiyama, H., Matsumoto, Y., Kimura, S., Matsubara, H., Taniwaki, M., Maekawa, T.: Kinetics of circulating endothelial progenitors in patients with sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 14(4):426-437, 2008.
2. Kuroda, J., Kimura, S., Kamitsuji, Y., Yokota, A., Ashihara, E., Kawata, E., Takeuchi, M., Tanaka, R., Tanaka, H., Matsumoto, Y., Andreeff, M., Taniwaki, M., Maekawa, T. : ABT-737 is a useful component of combinatory chemotherapies for chronic myelogenous leukaemias with diverse drug resistance mechanisms. *Brit J Haematol*, 140(2):181-190, 2008.
3. Deguchi, Y., Kimura, S., Ashihara, E., Niwa, T., Hodohara, K., Fujiyama, Y., Maekawa, T. Comparison of imatinib, dasatinib, nilotinib, and INNO-406 in imatinib-resistant cell lines. *Leuk Res*, 32(6):980-983, 2008.
4. Kuroda, J., Kamitsuji, Y., Kimura, S., Ashihara, E., Nakagawa, Y., Kawata, E., Takeuchi, M., Murotani, Y., Yokota, A., Tanaka, R., Andreeff, M., Taniwaki, M., Maekawa, T.: Anti-myeloma effect of Homoharringtonine with concomitant targeting of multiple myeloma-promoting molecules, Mcl-1, XIAP and b-catenin. *Int J Hematol*, 87(5):507-515, 2008.
5. Kitawaki, T., Kadowaki, N., Kondo, T., Ishikawa, T., Ichinohe, T., Teramukai, S., Fukushima, M., Kasai, Y., Maekawa, T., Uchiyama, T.: Potential of dendritic cell immunotherapy for relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, shown by WT1 peptide- and keyhole limpet hemocyanin-pulsed, donor-derived dendritic cell vaccine for acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*, 83(4):315-317, 2008.
6. Morinaga, K., Yamauchi, T., Kimura, T., Maekawa, T., Ueda, T.: Overcoming imatinib resistance using Src inhibitor CGP76030, Abl inhibitor nilotinib, and Abl/Lyn inhibitor INNO-406 in newly established K562 variants with *BCR-ABL* gene amplification. *Int J Cancer*, 122(11):2621-2627, 2008.
7. Tanaka, R., Kuroda, J., Stevenson, W., Ashihara, E., Ishikawa, T., Taki, T., Kobayashi, Y., Kamitsuji, Y., Kawata, E., Takeuchi, M., Murotani, Y., Yokota, A., Hirai, M., Majima, S., Taniwaki, M., Maekawa, T., Kimura, S.: Detection of the V617F mutation in JAK2 using a novel, fully automated, SNP super-rapid detector. *Leuk Res*, 32(9):1462-1467, 2008.
8. Muramatsu, H., Kimura, S., Ichinohe, T., Ashihara, E., Ishikawa, T., Maekawa, T., Uchiyama, T. : Consulting clinic for related family donors in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 41(12):1073-1075, 2008.
9. Kamitsuji, Y., Kuroda, J., Kimura, S., Toyokuni, S., Watanabe, K., Ashihara, E., Tanaka, H., Watanabe, M., Matsubara, H., Mizushima, Y., Hiraumi, Y., Kawata, E., Yoshikawa, T., Maekawa, T., Nakahata, T., Adachi, S.: Modes of cell death execution and autophagy by INNO-406, a Bcr-Abl kinase inhibitor, in Bcr-Abl-positive leukemias. *Cell Death Diff*, 15(11):1712-1722, 2008.
10. Kawata, E., Ashihara, E., Kimura, S., Takenaka, K., Sato, K., Tanaka, R., Yokota, A., Murotani, Y., Kamitsuji,

- Y., Takeuchi, M., Kuroda, J., Tanaka, F., Yoshikawa, T., Maekawa, T.: Administration of PLK-1 siRNA with atelocollagen prevents the growth of liver metastases of lung cancer. *Mol Cancer Therapeutics*, 7(9):2904-2912, 2008.
11. Okano, A., Ashihara, E., Shimazaki, C., Uchiyama, H., Inaba, T., Taniguchi, K., Maekawa, T., Taniwaki, M.: Predictive parameters for granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell mobilization. *J Apheresis Sci*, 23:171-177, 2008.
 12. Yuasa, T., Sato, K., Ashihara, E., Takeuchi, M., Tsuchiya, N., Habuchi, T., Maekawa, T., Kimura, S.: Intravesical administration of gd T cells successfully prevents the growth of bladder cancer in the murine model. *Cancer Immunol Immunotherapy*, 58(4):493-502, 2009.
 13. Koto, K., Horie, N., Kimura, S., Murata, H., Sakabe, T., Matsui, T., Koto, K., Watanabe, M., Adachi, S., Maekawa, T., Fushiki, S., Kubo, T.: Clinical relevant dose of zoledronic acid inhibits spontaneous lung metastasis in a murine osteosarcoma model. *Cancer Lett*, 274(2):271-278, 2009.
 14. Taniguchi, K., Shimazaki, C., Ochiai, N., Maruya, E., Akatsuka, Y., Ashihara, E., Maekawa, T., Taniwaki, M., Saji, H.: Modified elispot assay may predict T-cell hyporesponsiveness to non-inherited maternal antigens in healthy individuals. (*Int J Lab Hematol*, in press, 2009)
 15. Ashihara, E., Kawata, E., Nakagawa, Y., Shimazaki, C., Kuroda, J., Tanaka, R., Yokota, A., Murotani, Y., Takeuchi, M., Kamitsuji, Y., Inaba, T., Taniwaki, M., Kimura, S., Maekawa, T.: β -catenin siRNA successfully suppressed progression of multiple myeloma in a mouse model (*Clin Cancer Res*, in press, 2009)
 16. Matsumoto, S., Tanaka, F., Sato, K., Kimura, S., Maekawa, T., Hasegawa, S., Wada, H.: Monitoring with a non-invasive bioluminescent vivoimaging system of pleural metastasis of lung carcinoma. (*Lung Cancer*, in press, 2009.)
 17. 笠井泰成、前川 平：本邦における安全な細胞療法の実施に向けて。血液フロンティア、18(1): 69-73, 2008.
 18. 笠井泰成、前川 平：細胞プロセッシングセンター。□ 遺伝子 MOOK 「歩みつづける細胞移植療法の実際：再生医療の実現に向けた科学・技術と周辺要素の理解」、メディカル ドゥ、大阪。(印刷中、2009)
 19. 西川昭子、村山敏典、前川 平：産業界のためのガイドンスー第 I 相 研究新薬のための CGMP (Guidance for Industry - CGMP for Phase I Investigational Drugs). 臨床評価 (印刷中、2009)
 - 2) 学会発表 (細胞プロセッシング関係のみ)
 20. 前川 平：国際共同治験の現状と課題 - 治験責任医師 Physician Scientist の立場から -。国際共同治験推進会議 in Hamamatsu (浜松) 平成 20 年 1 月 26 日 (2008)
 21. Maekawa, T.: On the cutting edge of cellular and molecular therapeutics developed in Kyoto university hospital. (Invited Plenary Lecture) The Annual Symposium 2008 of the Korean Society for Laboratory Medicine (Seoul, Korea) (April 10, 2008)

分担研究報告書

4. 臍帯血移植後の免疫機構再構築に関する研究

分担研究者:平家 俊男

(京都大学医学研究科発達小児科学助教授)

研究要旨

我々は既に臍帯血 CD34+細胞を我々の開発した免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} 移植し、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺等におけるヒト血液細胞の出現を確認した。出現ヒト血液細胞分画として、従来の免疫不全マウスでは認められないヒト T 細胞の出現も確認し、すべての系統への分化を確認した。また従来の検討では触れられていない肥満細胞についても、マウス皮膚においてヒト肥満細胞の出現を確認した。一方、sIL-6R を含むサイトカインの組み合わせを用いて増幅した細胞の幹細胞活性を、免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} を用いて検討し、ヒト造血細胞の出現を確認することにより、ヒト造血幹細胞活性を評価するモデル系としての妥当性を確認するとともに、ヒト特異的免疫機構の解析、ヒト特異的感染症防御機構の解析、アレルギー疾患の解析等、幅広い領域での応用展開を試みている。

このマウスにおいては、骨髄、脾臓において、成熟した B 細胞の出現が確認でき、末梢血液においては、ヒト IgM, IgG の存在が確認できた。しかし、特異抗体産生は確認できず、より精微なヒトモデル系の確立に向けて、検討を進めている。

A. 研究目的

Ex vivo 増幅造血幹細胞の臨床応用の為には、造血幹細胞の異種動物を用いた活性評価が不可欠である。異種動物への移植に際して、移植細胞の生着を許容するには、異種動物の持つ免疫機構が大きな障害となる。我々は、種々の免疫機構の障害を有する免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} を作成し、ヒト臍帯血の生着が可能であることを確認している。本研究においては、免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} が、ヒト造血幹細胞の幹細胞活性評価における有用性について検討を進める。さらに、近年、造血（幹）細胞の他組織への可塑性について注目が集まっているが、寄与する細胞分画やその機構に関しては、不明の点が多い。NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスを用いることにより、ヒト細胞における分化可塑性の検討が可能となる。

さらに、ヒト免疫機構をもったモデルマウスにおいては、ヒト特異的な病態解析が可能となる。例えば、ヒト特異的感染症の解析、アレルギー疾患の解析等の研究が可能となり、治療基盤開発等に大きく寄与することが期待できる。

B. 研究方法

ヒト臍帯血由来 CD34+細胞を、放射線照射した免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} に移植し、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺への、ヒト細胞の生着の動態を検討する。従来の免疫不全マウス NOD/SCID においては、ヒト T 細胞の出現が明らかでなかったが、NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスを用いることにより、ヒト T 細胞を含むすべての系統への分化の検証がなされ、ヒト幹細胞活性評

価のために、同マウスが有用であることが示された。本研究においては、IL-6/soluble IL-6R を含むサイトカインで ex vivo 増幅を行ったヒト造血幹細胞について、同様の方法にて造血幹細胞活性測定を行う。さらに、ヒト臍帯血 CD34+細胞移植を行った NOD/SCID/ γ_c^{null} マウス由来骨髄細胞を用いて second transplantation を行い、骨髄再構築の有無について検討する。また、ヒトへの応用を視野に入れ、無血清培地で ex vivo 増幅したヒト臍帯血 CD34+細胞を用いて、同様の実験を行う。さらに、NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスにおいて構築されるヒト免疫機構において、T 細胞、NK 細胞、B 細胞の機能評価を行う。一方、このようにして作成したヒト造血組織、免疫組織を有するモデルマウスにおいて、ヒト造血幹細胞移植に伴う拒絶、GVHD 等の免疫現象回避に向けた方策を検討するとともに、ヒト特異的感染症、アレルギー免疫疾患の病態解析、治療基盤開発を行う。

C. 研究結果

我々は、既に臍帯血 CD34+細胞を我々の開発した免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} 移植し、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺等におけるヒト血液細胞の出現を確認した。さらに、その分化の方向性についても検討し、従来の免疫不全マウスでは認められないヒト T 細胞をも含むすべての系統への分化を確認した。これらの T 細胞は、TCR の多様性を持ち、CTL 活性等の機能も有することを明らかにした。また、マウス皮膚において、ヒト肥満細胞の出現を確認し、本モデルマウスがヒトアレルギー疾患解析に向けたツールとなり得るこ

とも明らかとなった。

一方、骨髄、脾臓においては、成熟した B 細胞の出現が確認できるし、末梢血中には、ヒト IgM, IgG が確認できるが、既知抗原の投与による特異抗体の産生は確認できていない。今後、特異抗体産生が可能となる条件設定に向けて、さらなる検討を行う。

D. 考察

免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} において、ヒト臍帯血 CD34+細胞よりの T 細胞を含む全血球への分化を証明した。マウス、ヒトの異種動物間において、免疫学的バリアーを超えて、ヒト血球細胞の出現が確認できたことは驚きに値する。この結果、ヒト造血組織構築、免疫組織構築に機構解析に有用な知見が得られるばかりでなく、ヒト疾患の解析、治療基盤開発といった臨床展開が大きく期待できる

E. 結論

免疫不全マウス NOD/SCID/ γ_c^{null} に、ヒト造血幹細胞を移植することにより、ヒト造血組織、免疫組織が構築できた。物理的問題、倫理的問題等で、検討が困難であったヒト特異的な造血機構、免疫機構の解析がモデルマウスを用いて可能となった。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

Ma F, Kambe N, Dan W, Shinoda G, Fujino H, Umeda K, Fujisawa A, Ma L, Suemori H, Nakatsuji N, Miyachi Y, Torii R, Tsuji K, Heike T, Nakahata T: Direct Development of Functionary Mature Trypsin/Chymase Double-Positive Connective Tissue-Type Madt Cells from Primate Embryonic Stem Cells. *Stem*

Cells 26:706-714, 2008

Tsuji S, Yoshimoto M, Takahashi K, Noda Y, Nakahata T, Heike T: Side population cells contribute to the genesis of human endometrium. *Fertility and Sterility* 90(2):1528-1537, 2008

Tsuchiya A., Heike T., Baba S., Fujino H., Umeda K., Matsuda Y., Nomoto M., Ichida T., Aoyagi Y., Nakahata T.: Sca-1+ endothelial cells (SPECs) reside in the portal area of the liver and contribute to rapid recovery from acute liver disease. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 365:595-601, 2008.

Saito M., Nishikomori R., Kambe N., Fujisawa A., Tanizaki H., Takeichi K., Imagawa T., Iehara T., Takada H., Matsubayashi T., Tanaka H., Kawashima K., Kagami S., Kawai T., Okafuji I., Yoshioka T., Adachi S., Heike T., Miyachi Y., Nakahata T.: Disease-associated CIAS1 mutations induce monocyte death, revealing low-level mosaicism in mutation-negative cryopyrin-associated periodic syndrome patients. *Blood* 111:2132-2141, 2008.

Yamanaka Y., Kumada T., Heike T., Shibata M., Takaoka Y., Kitano A., Shiraishi K., Kato T., Nagato M., Okawa K., Furushima K., Nakao K., Aizawa S., Nakamura Y., Taketo M.M. Nakahata T.: Loss of Borealin/DasraB leads to defective cell proliferation, p53 accumulation and early embryonic lethality. *Mech. Develop.* 125:4441-450, 2008.

Nagao K, Ohta T, Tahara T, Hasiwara T, Naeda Y, Yoneyaya T, Sohma Y, Heike T, Nakahata T, Inagaki Y, Nishikawa M: Expression profile analysis of aorta-gonad-mesonephros region-derived stromal cells reveals genes that regulate hematopoiesis. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 205-209, 2008

2) 学会発表

西小森隆太、斉藤潤、酒井秀政、河合朋樹、平家俊男、中畑龍俊：全身性自己炎症症候群の病態とマネージメント（シンポジウム 小児リウマチ性疾患の難治性病態）、第52回日本リウマチ学会総会・学術集会、2008. 4

平家俊男：iPS細胞研究に貢献する次世代シーケンス、BTJプロフェッショ

ナルセミナー「次世代シーケンサーが
変えるバイオ研究の未来」、2008. 9

齋藤潤、西小森隆太、河井朋樹、酒井
秀政、平家俊男、中畑龍俊、梅林宏明、
蛇川大樹、三浦克志、稲垣徹史：新規
CIAS1 変異を認めたマザイク方クリオ
ピリン関連周期熱症候群の一例。
第1回日本免疫不全症研究会、2008. 1

河合朋樹、西小森隆太、齋藤潤、岡藤
郁夫、平家俊男、中畑龍俊：分類不能
型免疫不全症状 (CVID) 様に発症し
た Multiple reversion による非典型
的 X-linked severe combined
immunodeficiency (SCID-X1) の一例。
第7回小児免疫・アレルギー研究会、
2008. 2

丹羽明、梅田勝嗣、張 璽、深津智樹、
才田聡、栗屋智就、加藤格、森嶋達也、
田中孝之、沖田圭介、高橋和利、中川
誠人、山中伸弥、平家俊男、中畑龍俊：
マウス iPS 細胞からの試験管内造血誘
導における、分化過程の経時的解析と
ヘマンギオブラストの同定。 第7
0回日本血液学会総会、2008. 10

Kawai T, Nishikomori R, Murata Y,
Sakai H, Heike T, Nakahata T: A novel
hypomorphic NEMO mutation caused
atypical incontinentia
pigmenti (IP) whose skins
manifestations triggered by viral
infections. 第38回日本免疫学会総
会 2008. 12

分担研究報告書

5. 造血幹細胞移植後ウイルス感染症の動態に関する研究

分担研究者：清水 則夫
（東京医科歯科大学准教授）

研究要旨

移植後は免疫抑制剤の使用などにより免疫不全状態となるため、患者は様々な感染症を発症し、しばしば致命的な経過をとる。移植後免疫不全状態で潜在する病原体の再活性化を早期に検出・同定し対処することは移植関連死亡を減少させる上で非常に重要な課題である。本研究では、移植医療に際して重要な感染症である肝疾患の発症に関与するウイルス群を同時に検出・定量するための検査セットを構築し、その検証を行った。

A. 研究目的

近年、臍帯血移植は、骨髄移植で問題となるドナー負担がなく、ドナーの事情に配慮した移植時期の遅延の問題がなく適切な時期に移植を行なえる、などの長所があるため、臍帯血移植と骨髄移植の移植数は拮抗するまでに臍帯血移植は普及してきた。しかし、上記の長所がある反面、移植関連死亡が50%に達し、その約半数は感染症による死亡と報告されている。生着不全や拒絶が多いことや生着例でも造血幹細胞の生着が遅れることがその原因であり、移植患者の免疫力の回復が遅れることが感染症のリスクを高めている。さらに、移植後の免疫抑制剤の使用、あるいはGVHDの発症により、移植患者は深い免疫不全状態に陥るためCMV、EBV、アデノウイルスなどの感染症に罹患し、しばしば致命的

な経過をとることも経験される。移植後免疫不全状態でのウイルスの再活性化と症状発現の関係を明らかにすることは移植関連死亡を減少させる上で重要な課題と考えられる。しかし、移植後には発熱、下痢、肝障害、皮疹、血球減少など様々な病態が複合的に絡んでいるため、移植後の感染症にどのようなウイルスがどれくらいの率で関与しているのか詳細な解析はなされていない。そのような情報不足が有効な予防法や治療法を確立するための大きな制約要因となっている。本研究では移植医療の成功率を高めるため、臍帯血移植の重大な合併症のひとつである肝疾患の発症に関係するウイルス群を迅速・簡便・高感度に検出・定量することが可能な検査系を実用化することを目的に研究

を行った。

B : 研究方法

1. 検査項目

肝炎の発症に関連するウイルスとして、以下のウイルスを選定した。

RNA ウイルス

A 型肝炎ウイルス : HAV

C 型肝炎ウイルス : HCV

E 型肝炎ウイルス : HEV

G 型肝炎ウイルス : HGV

D 型肝炎ウイルス : HDV

DNA ウイルス

B 型肝炎ウイルス : HBV

TT ウイルス : TTV

アデノウイルス : ADV

EB ウイルス : EBV

サイトメガロウイルス : CMV

2. 検査系の構築

A. 検査系の概要

今回対象とする病原体はDNAウイルス、RNAウイルスを含むため、ワンステップRT-PCR法によりDNA/RNAウイルスを一回の検査により同時に検出・定量することが可能な検査系の構築を試みた。検査手順としては、末梢血検体から直接DNAを抽出し、さらに血漿からRNAを抽出して、両方の核酸溶液を混合してワンステップRT-PCRを行う事とした。

B. PCR反応

PCR装置 : 反応を迅速に行なうため、キャピラリーPCR装置ライトサイクラー (ロシュ社) を使用した。

PCR 試薬 : AccuPrime Taq DNA Polymerase System (Invitrogen社)

C. プライマー・プローブ

各種ウイルスに対するプライマー配列およびプローブ (Taqmanプローブ) の配列を以下に

示す。

HAV (5' 末端側 NC 領域)

Forward - Rggtaggctacgggtgaaacc

Reverse- gccgctgtttaccctatccaa

Probe FAM- tacttctatgaagagatgc-MGB

HBV (HBs 抗原領域)

Forward - gtggtagacttctctcaattttctag

Reverse- ggacaMacgggcaacatacct

Probe FAM- tgtctcgcggcgtttt -MGB

HCV (5' 末端側 NC 領域)

Forward - gtctagccatggcgtagta

Reverse- ctcgcaagcacccctatcagcagt

Probe FAM- tgcggaaccggtagt-MGB

HDV (ribozyme and antigenome ribozyme I 領域)

Forward - GCATGGTCCCAGCCTCC

Reverse- TCITCGGGTCGGCATGG

Probe FAM- ATGCCCLaGGLtCGGAC-TAMRA

HEV (ORF 3 領域)

Forward - GGTGGTTTCTGGGGTGAC

Reverse- AGGGGTTGGTTGGATGAA

Probe FAM- TGATTCTCAGCCCTTCGC -TAMRA

HGV (5' 末端側 NC 領域)

Forward - CGGCCAAAAGGTGGTGGATG

Reverse- CGG TAGGGCCAACACCTGTGGA

Probe FAM-CAGGGTTGGTAGGTCGTAATCCCGGTCA-TAMRA

TTV (ORF 2 領域)

Forward - TCCGAATGGCTGAGTTT

Reverse- CGAATTGCCCTTGACT

Probe FAM- ACTCACCTHCGGCACCCGC-iowaBK

ADV

F- gacatgacttttgaggtagga

R- tcgatgaccccgcggtg

P-FAM-cccattggaYgagcccaacct-TAMRA

CMV

F- catgaaggtctttgccagtagc

R- ggccaaagttaggctacaatag

P- FAM-tggcccgttaggtcatccacactagg-TAMRA

EBV

F- cggaagccctctggacttc

R- cccgtttatccgatggaatg

P- FAM-tgtacacgcacgagaaatgcgcc-TAMRA

3. 検査系の感度測定および特異性の確認

(1) スタンダード作成

各種ウイルスのPCR産物をクローニングしシーケンスにて配列確認した後、制限酵素ScaIにて消化、一本鎖にしてフェノールクロロホルム処理し、エタノール沈殿後、OD値を測定した。電気泳動の結果とOD値から濃度を算出してコピー数をもとめ、ロシュ社製MS2RNA 10ng/ul溶液にて段階希釈して作成した。

(2) 特異性の確認

各種ウイルスPrimer、Probeの相同性をGenBankにて検索し特異性を確認した。また引用した文献にて特異性が調べられている場合はそれをもって替えた。陽性コントロールおよび各種ウイルスが検出された臨床検体を用いて、お互いの交差反応性が無いことを確認した。

4. 検査系のバリデーション

各種ウイルス検査系に対して、特異性(他の披検ウイルスを誤って検出する交差反応性の有無)、真度(真値として認証または合意された値と実測値との間の一致の程度)、精度(併行制度と室内再現精度、日間再現精度)に関するバリデーションを行い、検査系が設計した性能を持つことを検定した。

(倫理面への配慮)

ウイルス陽性検体は、匿名化した上で受け取り、患者の個人情報と解析結果との連結が不可能なように配慮した。また、ウイルス検査以外の検査(遺伝子検査など)は一切行わな

いこととした。

C: 結果

1. ウイルス検査系の検出感度測定

各種ウイルススタンダードを用いて感度を測定したところ、すべての検査対象ウイルスを10コピー/Tube以上の感度で検出可能だった。

2. 特異性の確認

GenBankのBRAST検索により、検査対象ウイルス間の交差反応性が無いことを確認した。また、HBVとHCVに関しては下記に示すように交差反応性が無いことをウイルス陽性サンプルを用いて確認した。

3. ウイルス検査系のバリデーション

各種ウイルス検査系に関して検査系が設計通りの性能を持つことを検証するためバリデーション作業を進めているが、これまでにHBVとHCVに関して作業が終了しているため、以下にその結果を示した。

A. HBV

・HBV測定用のプライマー・プローブ

	配列	GC%	Tm	長さ
Forward	gtgtgagcttctctcaatttttag	42	64	26
Reverse	ggacaMacaggcaacatacct	52-57	67-68	21
Probe	FAM-tgtctgagggtttt-MGB	53	70	15

・HBVサブタイプ間におけるマッチング

	F	Probe	R
A	gtgtgagcttctctcaatttttag	tgtctgagggtttt	aggtaagtgtgctttttgct
B
C
D
E
F
G
Hg

GenBank Accession Number A: AF090842, B: AF100309,

C: X04615, D: M32138, E: AB032431, F: AB036910,

G: AF160501, H: AY090454

・交差反応性

HBV検査系に関して他のDNAウイルスに対し

て検出しないことを定量系にて確認した結果、HSV1, 2, VZV, CMV, EBV, HHV6, HHV7, HTLV1, parvoB19, BKV, JCV との交差反応性は認められなかった。

・真度の検証

本定量系において 1000000 (e6), 10000 (e4), 100 (e2) Copy の 3 つの濃度について各濃度に対し一人 8 回を 3 名で延べ各 24 回を測定しその平均値を求めた結果は下記と通りであり、真度に問題は無いと判定した。

計算上のコピー数	e6	e4	e2
平均値	816304	9799	93

・測定者間再現性、日間再現性

3 名により、3 系統の希釈系列を 3 濃度においてランダムに試料を配置して各人 24 回実施し、さらに 3 日間、3 系統の希釈系列を 3 濃度においてランダムに試料を配置して 1 日各系統 8 回ずつ 7 2 回実施した結果、測定者間再現性と日間再現性には問題なかった。

B. HCV

・HCV 測定用のプライマー・プローブ

	配列	GC%	Tm	長さ
Forward	gtctagccatgagtttagta	50	59	20
Reverse	ctgcagagaccctatcagcagt	58	73	24
Probe	FAM-tgcggagccagctggt-MGB	63	74	16

注：MGB probe は Tm 値が計算値より 10 度高くなる。

・交叉反応性

他の RNA, レトロウイルス (HAV, HIV1, HIV2) に対して交差反応性が無いことを当該ウイルスの陽性コントロールを用いて確認した。

・真度の検証

本定量系において 1000000 (e6), 10000 (e4), 100 (e2) Copy の 3 つの濃度について各濃度に対し一人 8 回を 3 名で延べ各 24 回を測定しその平均値を求めた結果は次と通りであり、真度に問題は無いと判定した。

計算上のコピー数	e6	e4	e2
平均値	922833	9001	214

・測定者間再現性、日間再現性

3 名により、3 系統の希釈系列を 3 濃度においてランダムに試料を配置して各人 24 回実施し、さらに 3 日間、3 系統の希釈系列を 3 濃度においてランダムに試料を配置して 1 日各系統 8 回ずつ 7 2 回実施した結果、測定者間再現性と日間再現性には問題なかった。

・HCV サブタイプ間におけるマッチング

	F	Probe	R
AF000600 1a
AF011761 1a
AF271632 1a
AF350627 1b
AF139594 1b
D00208 1b
AB049088 1b
D14853 1c
AF160004 2a
D00944 2a
AB047639 2a	c.....
AB047641 2a
AB030907 2b
D10988 2b
AF238490 2b
AY232730 2b
D60409 2c
DQ158861 2b
AB051663 2k
AF040890 3a
D17763 3a	c.....
D49374 3b
D63821 3b
Y11604 4a	t.....
Y13184 5a
Y12083 6a
D84392 6b
D84263 6d
D63822 6g
D84205 6b
D84264 6k
D63821 110a
D63822 111a

今回作成した HCV の検査系は、主要なサブタイプを問題なく検出できることは、ウイルス陽性パネル血清を用いて確認した。

D: 考察

PCR法を利用したウイルス検査を行う場合には、サブタイプの存在を考慮したプライマー・プローブの設計を行うことにより、主要なサブタイプを全て検出し、さらにマイナーなサブタイプもできるだけもれなく検出できるような検査系を構築することが極めて重要である。そうした意味ではゲノムに塩基

置換が起こりやすいRNAウイルスで、しかも持続感染するためその頻度がより高まるHCVの検出系の作成が最も注意を要する。今回作成したHCV検査系では、より多くのサブタイプを検出できるようにすべく設計したプライマー・プローブは、全てのサブタイプと塩基配列が完全に一致するものを設計することはできなかった。特に、一部のサブタイプでプライマーFに一致しない配列が存在する。しかし、それが5'末端側にあることから実際にHCVゲノムを検出する際には支障ないものと考えており、陽性サンプルを用いた検討では現在までのところ検出もれは出ていない。またプローブにも一部のサブタイプに一致しない配列が認められますが、プローブのTm値が74℃と高いため実際の検出に支障はないものと考えている。今後HCVが陽性であることが予め判明しているサンプルを多数使用し、今回採用したプライマー・プローブの妥当性をさらに検証していくことが必要と考えている。

今回構築したウイルス検査系を活用することにより造血幹細胞移植後に生じる肝機能障害の原因を早期に確定してGVHDとの鑑別を行えるため、治療方針の決定に有用と考えられる。また、緊急手術を行う際に術者の安全性を確保するための迅速検査法としての活用や一般臨床検査への応用なども含め今後検討していきたい。

E: 結論

移植医療に際して重要な感染症をとして肝疾患の発症に関与するウイルス群として、HAV, HBV, HCV, HDV, HEV, HGV, TTV, ADV, EBV, CMVを選定し、同時・検出・定量が可能な検査セットを構築し、その検証を行った。検出は、DNA/RNAウイルスを一回の検査により

同時に検出・定量することができるようにキャピラリーPCR機を使用したワンステップRT-PCRを採用した。構築した検査系はすべてのウイルスを10コピー/Reactionの感度で検出できた。HBV, HCVに関しては、交差反応性、真度、測定者間・日差再現性などにも問題なく、実用に供せることを確認した。

F: 健康危険情報 なし

G: 研究発表

論文発表

1. Takahashi H, Sugita S, Shimizu N, Mochizuki M. A high viral load of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in ocular fluids in a HLA-B27 negative acute anterior uveitis patient with psoriasis. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 52(2):136-138, 2008
2. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Mizukami, Morio T, Sugamoto Y and Mochizuki M. Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. *British Journal of Ophthalmology*, 92(7):928-932, 2008.
3. Kido S, Sugita S, Horie S, Miyana M, Miyata K, Shimizu N, Morio T and Mochizuki M. Association of varicella zoster virus load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpette. *British Journal of Ophthalmology* 92(4):505-8. 2008.
4. Nakamura H, Ishii C, Suehiro M, Iguchi A, Kuroda K, Shimizu K, Shimizu N, Imadome K, Yajima M and Fujiwara S. The latent membrane protein 1 (LMP1) encoded by Epstein-Barr virus induces expression of the putative

oncogene Bcl-3 through activation of the nuclear factor- κ B.

Virus research, 131(2):170-179, 2008.

5. Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N, Fujiwara S.

A new humanized mouse model of Epstein-Barr virus infection that reproduces persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. Journal of Infectious Diseases, 198(5):673- 82, 2008.

6. Kanno H, Watabe D, Shimizu N, Sawai T. Adhesion of Epstein-Barr virus-positive natural killer cell lines to cultured endothelial cells stimulated with inflammatory cytokines. Clinical Experimental Immunology 151:519-527, 2008.

7. Imadome K, Shimizu N, Yajima M, Watanabe K, Nakamura H, Takeuchi H, Fujiwara S. CD40 signaling activated by Epstein-Barr virus promotes cell survival and proliferation in gastric carcinoma-derived human epithelial cells. Microbes and Infection (in press)

8. 木戸さやか、杉田 直、二神百合、堀江真太郎、佐々木秀次、望月 學、清水則夫、森尾友宏 ステロイド点眼治療中に樹枝状角膜炎を併発したヘルペス性角膜内皮炎の4例 臨床眼科 2008, 62:1061-1065.

9. 鴨居功樹、杉田直、木戸さやか、堀江真太郎、菅本良治、望月學、森浩士、宮永将、宮田和典、清水則夫 皮膚症状を伴わない水痘帯状 疱疹ウイルス前部ぶどう膜炎の3例 臨床眼科 2008, 62: 1067-1071.

国内学会発表

1. 今留謙一、矢島美彩子、清水則夫、中川温子、川野布由子、藤原成悦 NOG マウスを用いた慢性

活動性EBウイルス感染症モデルの作製 第5回 EBウイルス研究会 鳥取 7/18/2008

2. 鴨居功樹、杉田直、菅本良治、高瀬博、望月學、清水則夫、渡邊健 硝子体液の定量PCRで診断できた細菌および真菌混合感染による遅発性眼内炎の1例 第42回日本眼炎症学会 福岡市 7/4/2008

3. 山本紗也香、杉田直、二神百合、堀江 真太郎、望月學、清水則夫、森尾友宏 角膜病変を伴わないHSV-1関連虹彩毛様体炎の3症例 第42回日本眼炎症学会 福岡市 7/4/2008

4. 宮永将、杉田直、清水則夫、森尾友宏、宮田和典、望月學 サイトメガロウイルスによる虹彩炎と角膜内皮炎の臨床像比較 第62回日本臨床眼科学会 東京 10/26/2008

5. 山本紗也香、杉田直、森尾友宏、清水則夫、望月學 帯状疱疹に伴う角結膜炎の涙液中VZV-DNA 量および眼所見 第62回日本臨床眼科学会 東京 10/26/2008

6. 鴨居功樹、高瀬博、杉田直、菅本良治、田中裕一郎、望月 學、渡邊健、清水則夫 Broad-range PCR システムで診断した真菌性眼内炎の1例 第62回日本臨床眼科学会 東京 10/25/2008

7. 清水則夫 再生医療とウイルス安全性確保 第8回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム 東京 12/12/2008

国際学会発表

Fox CP, Long HM, Lowe C, Shimizu N and Rowe M. LMP2A AS A TARGET FOR T CELL RECOGNITION IN EBV-ASSOCIATED T AND NK CELL TUMOURS EBV Association General meeting, November 2008, Guangzhou, China.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

6. 臍帯血 DLI に向けた基盤整備及び臨床研究

「免疫不全マウスを用いた活性化 CD4-DLI 後の経時的
T 細胞の性質と動態に関する検討」

分担研究者:伊藤 仁也

分担研究者:鹿村 真之

(先端医療センター 細胞管理室)

研究要旨

我々は免疫不全マウスである NOD / Ltz / SCID マウスを用いて、ヒト腫瘍細胞とヒト免疫担当細胞の in vivo における免疫反応を見ることができる汎用性の高い動物モデルを作製した。このモデルマウスを用い、臍帯血 DLI の効果を検証する系の確立に先立って、成人末梢血活性化 T 細胞の抗腫瘍効果を検討した。

NOD / SCID マウスに EBV-LCL を輸注し、引き続いて同一ドナーより採取、活性化させた活性化 T 細胞を輸注した。今回の検討において、成人末梢血 T 細胞は抗腫瘍効果を示し、解剖時(移植 28 日目)でのマウスの死亡は見られなかった。また、輸注した T 細胞がマウス体内で増幅し、T 細胞分画は CD 8 陽性細胞であることが確認された。CD 8 陽性細胞は活性化を維持しており、エフェクター / メモリー分画ではエフェクター T 細胞及びエフェクターメモリー T 細胞の集団であった。また、これらの細胞は EBV-LCL に対して特異的に反応した。

DLI の作用機序はまだ解明されていないが、投与した T 細胞そのものが CTL となり増幅され Target となる腫瘍細胞を攻撃する系が存在すると考えられた。

A. 研究目的

ドナーリンパ球輸注療法 (Donor Lymphocyte Infusion: DLI) は 1990 年に Kolb らにより慢性骨髄性白血病(Chronic Myeloid / Myelocytic Leukemia: CML)に行われて以来、悪性腫瘍の免疫療法としては唯一の免疫療法として確立された療法である。しかし、多くの後方視臨床研究報告の結果、問題点も明らかとなりつつある。

まず、CML では 80 ~ 85%と高い効果が認められるが、同じ CML でも加速期、急性転期には 20%前後の有効率しか得られず、急性骨髄性白血病(Acute Myelogenous Leukemia: AML)、急性リンパ性白血病(Acute Lymphocytic Leukemia あるいは Acute Lymphoblastic Leukemia: ALL)においても 5 ~ 25%とあまり効果が認められていない。また、II 度以上の GVHD(Graft Versus Host Disease)の頻度が高く、致死的な GVHD も 7%前後認められる。更に、効果発現までにかかる時間は平均して 4ヶ月 ~ 6ヶ月と期間が長く、GVL(Graft Versus Leukemia effect)効果を得るためには 1×10^8 cells / kg の細胞数が必要となるためドナーにかかる負担が大きくなり臍帯血での実現は不可能であるとされている。

GVHD の原因の一つとして輸注する CD 8 陽性細胞が指摘されているが、DLI の作用機序はまだ十分解明されておらず、マイナー抗原などのアロ抗原を認識した HLA 拘束性の免疫反応であることが指摘されている。

そこで、これらの問題点を解決するために我々はリンパ球を抗 CD 3 抗体および IL-2

で活性化、増幅させたものを輸注する活性化 DLI を開発した。

今回我々は活性化 DLI の有効性の評価の為に免疫不全マウスである NOD /Ltz / SCID マウスに Epstein Barr Virus Lymphoblastoid Cell Line (EBV-LCL) を移植し、病態モデルマウスを作製した。その後、同一ドナーから採血して採取した成人末梢血単核球(Peripheral Blood Mononuclear Cell: PBMC)を用いた活性化 T 細胞で DLI を行った。DLI 後にマウス体内で増幅したヒト T 細胞の性質及び動態についての解析を行い、DLI 作用機序の検討を行った。

B. 研究方法

1) T 細胞活性化培養

健康成人ボランティアから採血を行い、PBMC を獲得した。この PBMC を Ficoll Paque (Amersham Biosciences) を用いて分離を行い、単核球を採取した。培養培地は RPMI 1640 +7 (日研生物医学研究所) に 10% となるよう FCS (JRH BIOCIENCES) を添加し、更に IL-2 (CHIRON) を 700 Units / mL で添加したものをを用いた。その後、OKT-3 抗体(ヤンセン協和)で固相化した、抗 CD 3 抗体固相化フラスコに採取したリンパ球を 1.0×10^6 / mL とするよう播種し、37 °C、RH 97%、CO₂ 5%のインキュベーター内で 2 週間培養した。培養開始 7 日目に OKT-3 刺激を排除し、培養液を添加し、IL-2 濃度を 350 Units / mL とした。その後、培養液を経日的に添加し最

終 IL-2 濃度を 175 Units / mL とし、培養 14 日目に洗浄を行いモデルマウスへ輸注した。

また、活性化培養 4 日目に DYNAL Beads (DYNAL BIOTECH) を用いて CD 4 セレクションを行い CD 4 陽性細胞に純化した細胞の活性化も行った。CD 4 セレクションを行った細胞は全血細胞と同様の培養を行い、培養 14 日目においての CD 4 陽性率は 99.07% であり、洗浄後モデルマウスへ輸注した。

2) モデルマウス作製

樹立した EBV-LCL を RPMI +7(10% FCS) にて培養を行った。培養後洗浄を行い、 1.0×10^6 cells / 200 μ l / mouse で RI を照射した NOD / LtZ / SCID マウス (5W、♂) に尾静脈から移植し、モデルマウスを作製した。

3) in vivo 実験

作製したモデルマウスに尾静脈より細胞を移植し、経時的な観察及び解析を行った。マウスは EBV-LCL 輸注群 (Control 群)、PBMC 全血 + EBV-LCL 輸注群 (Whole 群) 及び PBMC CD 4 陽性細胞 + EBV-LCL 輸注群 (CD 4 群) の 3 群とした。また、各群のマウスは 10 匹とした。PBMC 全血及び CD 4 陽性細胞は EBV-LCL 輸注 1 週間後に 1.0×10^7 cells / 200 μ l / mouse で輸注を行った。輸注後は経時的に眼窩採血、骨髄穿刺を行

い、輸注 28 日後に屠殺した。

4) マウス外観観察

実験開始後マウス外観及びマウス運動の観察を行った。また、経時的にマウス体重を測定した。

5) フローサイトメトリー

採取したマウス末梢血、骨髄液及び臓器をフローサイトメトリーにて以下の解析を行った。

- ・キメリズム解析 (CD 45 陽性率)
- ・腫瘍マーカー (CD 23) 陽性率
- ・T 細胞マーカー (CD 3) 陽性率
- ・ヒト細胞の解析
- ・T 細胞メモリー分画解析
- ・サイトカイン産生の解析

6) ELISPOT アッセイ

採取したマウス末梢血から Midi MACS を用いてヒト細胞を採取した。EBV-LCL Lysate を作製し、採取したヒト細胞と 24 時間共培養を行い、ELISPOT アッセイにより特異的な IFN- γ の産生量について解析した。

7) ATP アッセイ

採取したマウス末梢血から Midi MACS を用いてヒト細胞を採取した。採取したヒト細胞を EBV-LCL と 24 時間共培養し、24 時間後の ATP 量を解析し、細胞障害性能の検討を行った。

C. 研究結果

1) モデルマウス

EBV-LCL をマウスに輸注すると、マウス体重の減少が起こり、マウス血中及び骨髓液中に CD 23 陽性細胞の発現が確認された。CD 23 の発現は Day 7 で 0.82%、Day 21 で 1.51%、Day 29 マウス末梢血中で 0.45%、Day 29 骨髓液中で 2.01%。であった (Fig. 1)。以上のことからこのモデルマウスが白血化していることが確認された。

また、このモデルマウスでは白血化が先行して起こり、その後腎臓、脾臓、肝臓、胸腺、リンパ節、肺にヒト細胞の浸潤が見られ (Fig. 2)、肺への浸潤が見られ

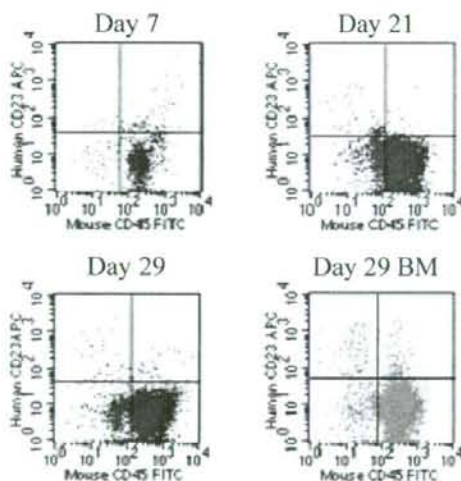


Fig. 1 モデルマウス CD 23 陽性率の推移

たマウスにおいては胸水も確認された。

死亡したマウスは全匹腎臓の腫大が確認された (Fig. 3)。腫大した腎臓は腎皮質を中心に腫瘍が浸潤し、髓質にま

でびまん性に腫瘍化していることが確認できた。これら腫瘍に浸潤している細胞は成熟 B 細胞であり、EBER 反応陽性であった。

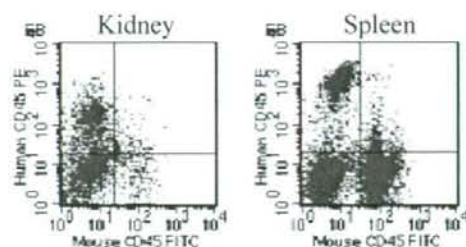


Fig. 2 臓器中 CD 23 陽性率



Fig. 3 マウス腎臓写真

2) マウス外観観察の検討

上記 1) のモデルマウスを用いて DLI を行い、経時的な検討を行った。

Fig. 4 にマウス体重率の推移を、Fig. 5 にマウス生存率の推移を示す。

EBV-LCL のみを移植した Control 群では細胞の移植後体重は減少し続け、28 日後には 80.00% のマウスが死亡した。Whole 群では体重の減少が抑制され、28 日後には移植前とほぼ同等の体重まで回復し、コントロール群と有意な差が認められた ($p < 0.001$)。その一方で CD 4 群においては、一時体重を保ったものの、移植 28 日後には再び減少した。し