

200934027A

---

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

臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と  
安全性確保に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

---

研究代表者 加藤 俊一

平成 22 年 (2010 年) 3 月

## はじめに

本報告書は、厚生労働科学研究・免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究」班における平成21年度（2009年度）の研究成果をまとめたものである。

本研究班は平成17～19年度の1期3年の研究成果を踏まえて、平成20年度より2期目の研究班として継続が認められたものである。1期目に引き続き、臍帯血移植に関する基礎的研究、臍帯血の採取と分離・調整・保存などの臍帯血バンク事業に関する研究、臍帯血移植に関する臨床的研究を系統的かつ網羅的に組織した。研究分担者のほとんどは1期目からの継続であるが、新たに数名の研究分担者に加わりいただき、より充実した研究体制を整えることができたと考えている。

1期目の成果としては、臍帯血採取法としてカンガルーケア法を推奨することを日本さい帯血バンクネットワークに提案したこと、臍帯血の品質評価法の標準化を推進したこと、造血幹細胞移植データの一元化を達成したこと、過去の臍帯血移植の成績を解析して学会報告や論文として数多く報告したこと、臨床研究支援システムを確立し複数臍帯血移植などの前向き臨床研究を実施したこと、臍帯血の医薬品化の可能性について検討した結果を厚生労働審議会造血幹細胞移植委員会に報告したこと、などがあげられる。

2期目2年目にあたる今年度の研究成果として特筆されることの第1は、臍帯血採取方法の改良として新たな採取バッグが開発され、習熟すれば従来よりも10～15ml多い臍帯血を採取できることが明らかにされたことである。

第2の成果は、移植前に患者が保有する抗HLA抗体が移植する臍帯血中の不適合HLA抗原と反応するような場合には生着不全の頻度が高くなることが明らかにされたことで、前年度の研究がさらに明確となり、国際的にも注目されている。

第3の成果として、複数臍帯血移植の臨床研究が目標の70例登録を達成して、登録を終了したことがあげられる。昨今多施設共同研究の実施には様々な困難がある中で目標例に到達できたことは、研究分担者の甲斐俊朗先生ならびに参加施設の諸先生の協力の賜と感謝申しあげたい。

本報告書は2期目2年度の研究業績の全体をとりまとめたもので、研究分担者ならびに研究協力者の方々に厚く御礼を申しあげる次第である。

2010年3月

研究代表者 加藤 俊一

## 研究班の構成

|                 | 氏 名                                | 所 属 ・ 役 職 ・ 専 門                     | 役 割 分 担                      |
|-----------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| 研究代表者           | 加藤 俊一                              | 東海大学医学部基盤診療学系・教授<br>造血幹細胞移植、再生医療科学  | 研究計画立案・総括                    |
| 研究分担者<br>(五十音順) | 東 英一                               | 三重大学医学部附属病院・准教授<br>細胞移植             | 麻疹ウイルスに対する DC ワクチンの開発        |
|                 | 足立 壮一                              | 京都大学大学院医学研究科・教授<br>発達小児科学           | 小児臍帯血移植の GVHD 予防法の確立         |
|                 | 熱田 由子                              | 名古屋大学医学部・助教<br>生物統計学, 臨床試験方法論       | 臍帯血移植臨床研究の管理と統計学的解析          |
|                 | 安藤 潔                               | 東海大学医学部内科学系・教授<br>血液学               | 臍帯血の骨髄内移植法の開発                |
|                 | 磯山 恵一                              | 昭和大学藤が丘病院・教授<br>小児血液学               | 小児臍帯血移植至適前処置法の確立             |
|                 | 甲斐 俊朗                              | 兵庫医科大学・教授<br>輸血学                    | 複数臍帯血の同時移植法の確立               |
|                 | 加藤 剛二                              | 名古屋第一赤十字病院・部長<br>小児血液学              | 臍帯血移植の感染症要因の解析と対策の検討         |
|                 | 河原 和夫                              | 東京医科歯科大学大学院・教授<br>医療政策学・政策科学        | 臍帯血の医薬品化に関する調査研究             |
|                 | 高梨 美乃子                             | 東京都赤十字血液センター・部長<br>輸血学              | 臍帯血の品質管理と評価法の確立              |
|                 | 高橋 聡                               | 東京大学医科学研究所・准教授<br>造血幹細胞移植           | 臍帯血移植後の精緻なキメリズム解析法の開発        |
|                 | 谷口 修一                              | 虎の門病院血液科・部長<br>造血幹細胞移植              | 高齢者における臍帯血移植 (骨髄非破壊的前処置法の確立) |
|                 | 田野崎 隆二                             | 国立がんセンター中央病院臨床検査部・医長<br>造血幹細胞移植     | 成人における臍帯血移植 (骨髄破壊的前処置法の標準化)  |
|                 | 長村 登紀子                             | 東京大学医科学研究所・講師<br>輸血部                | 臍帯血移植データベースの確立               |
|                 | 正岡 直樹                              | 東京女子医科大学・准教授 同附属<br>八千代医療センター婦人科・科長 | 臍帯血採取法の改良に関する研究              |
| 森尾 友宏           | 東京医科歯科大学医学部・准教授<br>同細胞治療センター・センター長 | 臍帯血移植における DLI の開発                   |                              |
| 研究班事務局          | 吉場 史朗                              | 東海大学医学部基盤診療学系・講師<br>造血幹細胞移植、再生医療科学  | 臨床研究管理                       |
|                 | 町田 友香                              | 東海大学医学部基盤診療学系                       | 研究班事務                        |

## 目 次

|   |    |
|---|----|
| I. 総括研究報告書                                | 1  |
| 加藤 俊一                                     |    |
| II. 分担研究報告書                               |    |
| 1. DC ワクチンを用いた臍帯血移植後のウイルス感染予防法の開発に関する研究   | 9  |
| 東 英一                                      |    |
| 2. 小児臍帯血移植におけるシクロスポリン至適使用法の検討             | 15 |
| 足立 壮一                                     |    |
| 3. 臍帯血移植臨床研究の管理と統計学的解析                    | 17 |
| 熱田 由子                                     |    |
| 4. 臍帯血幹細胞骨髄内移植に関する研究                      | 21 |
| 安藤 潔                                      |    |
| 5. 小児急性骨髄性白血病へ初回移植として行った非血縁臍帯血移植の長期予後について | 23 |
| 磯山 恵一                                     |    |
| 6. HLA-C,KIR-L 適合性と臍帯血移植成績                | 27 |
| 甲斐 俊朗                                     |    |
| 7. 臍帯血移植データ一元化の進捗状況                       | 31 |
| 加藤 剛二                                     |    |
| 8. 臍帯血バンクの効率性について                         | 35 |
| 河原 和夫                                     |    |
| 9. 臍帯血の品質管理と評価                            | 45 |
| 高梨 美乃子                                    |    |
| 10. 臍帯血移植後のキメリズム解析における現状とその問題点            | 49 |
| 高橋 聡                                      |    |
| 11. 高齢者における臍帯血移植（骨髄非破壊的前処置法の標準化）に関する研究    | 51 |
| 谷口 修一                                     |    |
| 12. 成人における臍帯血移植（骨髄破壊的前処置法の標準化）            | 55 |
| 田野崎 隆二                                    |    |
| 13. 臍帯血バンクにおける移植データ管理                     | 59 |
| 長村 登紀子                                    |    |
| 14. 臍帯血採取法の改良に関する研究                       | 63 |
| 正岡 直樹                                     |    |
| 15. ex vivo 増殖臍帯血 T 細胞 輸注療法の臨床研究          | 67 |
| 森尾 友宏                                     |    |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表                       | 73 |
| IV. 参考資料                                  | 91 |

# I. 総括研究報告

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  
総括研究報告書

臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究  
研究代表者 加藤 俊一（東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・教授）

研究要旨：わが国の臍帯血バンク事業における臍帯血の品質の向上と、臍帯血移植における成績の向上を目指して、臍帯血の採取から臍帯血幹細胞の分離・保存、臍帯血提供体制、臍帯血の移植と長期経過調査にいたるまでの一連のプロセスのすべてについて検証するために、研究班2期目の研究計画に則り基礎的あるいは臨床的な研究を実施した。

(1) 開発的基礎研究

- ・クローンレベルでの臍帯血移植後の造血動態の詳細が明らかにされた。(安藤 潔)
- ・「DC ワクチンを用いたウイルス感染予防法の開発」は健常人を対象とした第一相試験が開始され、安全性を示唆する結果が得られ始めた。(東 英一)
- ・「ex vivo 増幅臍帯血T細胞輸注療法の臨床研究」は自施設での倫理委員会承認の下、全国の施設に対するアンケートの結果を基にプロトコール作成が開始された。(森尾友宏)

(2) 臍帯血採取法の改良

- ・安定した臍帯血を採取する方法を開発するため採取バッグの改良を行い、採取量の増加が得られることが明らかになった。(正岡直樹)

(3) 臍帯血幹細胞評価法の標準化

- ・昨年度に続き、11の臍帯血バンクにおいて実施されている臍帯血幹細胞の品質評価方法についてバンク間比較と再現性試験（白血球数、生細胞率、CD34 陽性細胞数、コロニー形成試験など）を実施し、標準的方法の検討を進めた。(高梨美乃子)
- ・患者血清中の HLA 抗体が臍帯血と特異的に反応する場合には生着不全が増加することが示され、その成果が実際の診療に活かされ始めた。(高梨美乃子)

(4) 非血縁者間臍帯血移植の成績解析（後方視的研究）

- ・わが国において実施され調査票の報告システムの整備を進め、移植細胞数や HLA 適合度と移植成績の関係、GVHD、感染症などの合併症の実態、疾患別の移植成績を解析し、国内外の学会に報告と論文化が進められた。(加藤剛二、長村登紀子、熱田由子)

(5) 臨床研究（前方視的研究）

- ・「複数臍帯血移植」については順調に進行し、目標症例登録を完了した。(甲斐俊朗)
- ・「成人臍帯血移植多施設共同臨床研究」、「高齢者における臍帯血移植に関する研究」、「小児臍帯血移植におけるシクロスポリン至適使用法の検討」については症例の登録と移植の実施が進行している。(田野崎隆二、高橋聡、谷口修一、足立壮一)

(6) 臍帯血の医薬品化に関する研究

臍帯血の医薬品化に関して費用試算を中心とした検討を継続した。(河原和夫)

## A. 研究の目的と目標

わが国における臍帯血バンク事業における臍帯血の品質の向上と、臍帯血移植における成績の向上を目指して、臍帯血の採取から臍帯血幹細胞の分離・保存、臍帯血提供体制、臍帯血の移植と長期経過調査にいたるまでの一連のプロセスのすべてについて検証するために、研究班2期目の研究計画に則り基礎的あるいは臨床的な研究を実施することを目的とした。

## B. 研究計画

研究内容は臍帯血移植に関する基礎的研究、臍帯血の提供体制に関する基盤整備、臍帯血の移植方法の改良と確立に関する臨床的研究の3つに大別して、それぞれの研究分担者を中心として立案された研究計画に基づいて実施された。

### (倫理面への配慮)

これらの基礎的あるいは臨床的研究の実施にあつては、国の諸指針に基づいて被験者となる患者の人権に十分配慮するとともに、個人情報への厳格な管理を行った。

また、動物を用いた基礎実験の実施にあつては動物愛護の精神に基づいて適切な配慮と処置を行った。

## C. 研究結果

本年度は研究班として2期目の2年度にあたり、1期目から継続された研究をさらに推進し、ほぼ当初の計画どおりに実施することができた。

研究分担者の研究結果はそれぞれの分担研究報告書に詳細に記述されているとおりであるが、主な研究結果を以下に記述する。

## (1) 基礎的研究

- ・ 安藤潔研究分担者らは昨年度に引き続き、ヒト造血幹細胞のクローンレベルでの動態を解析するアッセイ系を用いて、臍帯血移植後の造血動態を明らかにした。移植された幹細胞は宿主骨髓ニッチに静止期で存在し、移植後に急速にクローンサイズを増大させて造血再構築を行うことがヒト造血幹細胞で明らかにされた。
- ・ 東英一研究分担者らは、麻疹ウイルスに対する臨床応用可能な DC ワクチンを作成し、施設内の倫理委員会の承認をえて第一相試験を開始した。本年度は移植後の5症例にワクチンを接種し、その安全性が確認されるとともに、麻疹抗体と麻疹特異的 B 細胞の増加を認めた。
- ・ 森尾友宏研究分担者らは、「ex vivo 増幅臍帯血 T 細胞輸注療法の臨床研究」のプロトコールを作成し、第 I 相臨床研究試験を開始できる体制を確立した。

## (2) 臍帯血提供体制の基盤整備

- ・ 正岡直樹研究分担者らは、臍帯血採取方法の安定化を目的として採取バッグを改良し、従来法よりも 5~20ml 程度の採取量を増加させることができることを明らかにした。
- ・ 高梨美乃子研究分担者らは、日本さい帯血バンクネットワークの 11 の臍帯血バンクにおいて実施されている臍帯血幹細胞の品質評価方法についてバンク間での比較と再現性試験を実施し、標準的方法の検討を進めた。今年度は臍帯血の品質標準化を目指し、

同一の凍結検体を配布して多施設比較試験を行った。

同一機種による白血球数、数種類の手技による生細胞率について施設間差は期待される範囲内であった。死細胞除去 gating を入れた標準法による CD34+細胞数とコロニー形成数は施設間差が大きかった。

また、昨年度の無菌検査の評価に基づき、新基準を策定した。

### (3) 臨床的研究

- ・ 甲斐俊朗研究分担者を中心として、複数臍帯血移植の臨床研究が順調に進捗した。本年度は目標の 70 例の登録が達成された。キメリズムの解析も順調に進み、今後 1 年間の経過観察の後に臨床研究を終了できる見通しとなった。
- ・ 田野崎隆二研究分担者を中心として、成人における至適治療法確立のための前向き臨床研究が進められ、6 例の症例登録と移植が実施された。
- ・ 足立壮一研究分担者を中心として、小児臍帯血移植におけるシクロスポリン至適使用法の検討のための臨床研究が開始され、4 例が登録された。
- ・ 谷口修一研究分担者を中心として、55 歳以上の高齢造血器疾患患者に対する臍帯血移植の後方視的検討により、血縁ドナーからの移植と同等の成績が期待できる可能性があることが示された。
- ・ 高梨美乃子研究分担者を中心として、移植時に患者血清中に臍帯血と反応する特異的 HLA 抗体が存在すると生着不全の頻度が高くなり、生存率も低

下することが示された。

- ・ 高橋聡研究分担者を中心として、HLA ミスマッチ造血幹細胞移植後の新規キメリズム解析法が開発され、フローサイトメトリーを用いて細胞系列毎の精緻なキメリズムの解析が可能であることが示された。
- ・ 熱田由子研究分担者を中心として、質の高い臨床研究の進捗管理体制が確立され、複数臍帯血移植と成人臍帯血移植の臨床研究の進捗管理が行われた。
- ・ 加藤剛二・長村登紀子研究分担者らを中心として、日本造血細胞移植学会・日本小児血液学会・骨髄バンク・日本さい帯血バンクネットワークの 4 レジストリーによる移植報告一元管理システム (TRUMP) のデータベースの基盤整備が進められた。

### (4) 臍帯血の医薬品化に関する研究

- ・ 河原和夫研究分担者を中心にして、平成 20 年度の 11 臍帯血バンクの公開データをもとに、プロセスと品質の 2 点についての比較と、ベストプラクティスとパフォーマンスの推定が行われた。

## D. 結論

移植される臍帯血の品質と安全性向上、臍帯血移植の成績向上を目的として、後方視的ならびに前方視的研究を実施し、臍帯血採取法の改良、品質評価法の標準化、移植方法の改良などについての提案を行うと同時に、研究成果を学会や論文として報告して医療現場と社会に還元することができたと考えている。



## E. 健康危険情報

前向き臨床研究において、通常の造血幹細胞移植でみられる有害事象が発生したが、本研究固有の健康危険情報はなかった。

## F. 研究発表

### 1. 著書

- 1) 加藤俊一. 日本移植学会の倫理指針. 「腎移植のすべて」高橋公太編集、2009, pp506-507.
- 2) 加藤俊一、矢部普正編. 「小児の造血幹細胞移植」、医薬ジャーナル社、東京、2010、pp1-107.

### 2. 論文発表

- 1) Atsuta Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T, Taniguchi S, Takahashi S, Kai S, Sakamaki H, Kouzai Y, Kasai M, Fukuda T, Azuma H, Takanashi M, Okamoto S, Tsuchida M, Kawa K, Morishima Y, Kodera Y, **Kato S**; Japan Cord Blood Bank Network. Disease-specific analyses of unrelated cord blood transplantation compared with unrelated bone marrow transplantation in adult patients with acute leukemia. **Blood**. 2009 Feb 19;113(8):1631-8.
- 2) Oda M, Isoyama K, Ito E, Inoue M, Tsuchida M, Kigasawa H, Kato K, **Kato S**. Survival after cord blood transplantation from unrelated donor as a second hematopoietic stem cell transplantation for recurrent pediatric acute myeloid leukemia. **Int J Hematol**. 2009 Apr;89(3):374-82.
- 3) Yazaki M, Atsuta Y, Kato K, **Kato S**, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Kouzai Y, Kobayashi T, Inoue M, Kobayashi R, Nagamura-Inoue T, Azuma H, Takanashi M, Kai S, Nakabayashi M, Saito H; Japan Cord Blood Bank Network. Incidence and risk factors of early bacterial infections after unrelated cord blood transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**. 2009 Apr;15(4):439-46.
- 4) Isoyama K, Oda M, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kai S, Kigasawa H, Kobayashi R, Mimaya J, Inoue M, Kikuchi A, **Kato S**. Long-term outcome of cord blood transplantation from unrelated donors as an initial transplantation procedure for children with AML in Japan. **Bone Marrow Transplant**. 2009 May 11.

- 5) Kudo K, Ohga S, Morimoto A, Ishida Y, Suzuki N, Hasegawa D, Nagatoshi Y, **Kato S**, Ishii E. Improved outcome of refractory Langerhans cell histiocytosis in children with hematopoietic stem cell transplantation in Japan. **Bone Marrow Transplant**. 2009 Sep 21.
- 6) Ohga S, Kudo K, Ishii E, Honjo S, Morimoto A, Osugi Y, Sawada A, Inoue M, Tabuchi K, Suzuki N, Ishida Y, Imashuku S, **Kato S**, Hara T. Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. **Pediatr Blood Cancer**. 2010 Feb;54(2):299-306.
- 7) Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, **Kato S**, Kawase T, Muramatsu H, Morishima Y, Kodera Y. Tacrolimus/Methotrexate versus cyclosporine/methotrexate as graft-versus-host disease prophylaxis in patients with severe aplastic anemia who received bone marrow transplantation from unrelated donors: results of matched pair analysis. **Biol Blood Marrow Transplant**. 2009 Dec;15(12):1603-8. Epub 2009 Oct 4.
- 8) 田淵 健、気賀沢寿人、吉見礼美、熱田由子、足立壮一、磯山恵一、井上雅美、加藤剛二、河野嘉文、菊地 陽、小林良二、土屋 滋、堀越泰雄、矢部普正、渡辺 新、加藤俊一 小児期造血幹細胞移植全国集計 (1983-2005) -細胞源ドナー別移植成績 **日本小児血液学会雑誌** 2009;23: 142-154.
- 9) 加藤俊一. 小児期に造血幹細胞移植を受けた長期生存者におけるQOL評価法ガイドライン作成に向けて. **日本小児血液学会雑誌**, 2009;23:161-164.
- 10) 渡辺 新、掛江直子、坂本なほ子、加藤俊一. 同胞小児ドナーになることの正確な理解に役立つ年齢群別パンフレットの作成. **日本小児血液学会雑誌**, 2009;23:155-160.

### 2. 学会発表

- 1) Takakura H, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Yanagimachi N, Yabe M, Yabe H, Tanaka A, **Kato S**. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Inborn Errors in Metabolism (IEM) - A single institute

experiences – The 3<sup>rd</sup> International  
Symposium of Lysosomal Storage Diseases.  
2009 Sep.26-27, Nagoya.

- 2) 加藤俊一. 多様化する造血細胞移植.  
第 51 回日本小児血液学会総会. 2009 年  
11 月、東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許：第 4437335 号

名称：「ヒト未分化造血幹細胞およびそ  
の分離方法ならびに分離装置」

発明者：加藤俊一、中村嘉彦

取得日：平成 22 年 1 月 15 日

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

## II. 分担研究報告

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

臍帯血を用いる造血細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究

研究課題：DC ワクチンを用いた臍帯血移植後のウイルス感染予防法の開発に関する研究

研究分担者 東 英一（三重大学医学部附属病院細胞移植療法部・准教授）

研究要旨

臍帯血移植 (CBT) を含む造血細胞移植 (HCT) 後の免疫抑制期において、サイトメガロウイルス (CMV)、Epstein-Barr ウイルス (EBV)、アデノウイルス (ADV) などのウイルス感染症は時に重症化し、致命的となる。また、本邦など、時に麻疹の流行を認める地域においては、HCT 後の麻疹ウイルス (MV) 感染症の致命率が高いことも報告されている。今回、我々は、樹状細胞 (DC) ワクチンの手法を用いた MV に対するワクチンの第 I 相臨床試験を開始した。

共同研究者

熊本忠史・三重大学大学院医学系研究科・病態解明医学講座・小児発達医学・助教

平山雅浩・三重大学医学部附属病院・小児科・講師

A. 研究目的

HCT 後の免疫抑制状態のため既存のワクチン接種が困難な患者に対する、抗麻疹樹状細胞ワクチン (MV-DC ワクチン) の第 I 相臨床試験を実施し、安全性と有効性をみる。プライマリーエンドポイントを安全性の確認とし、セカンダリーエンドポイントを 1) 血清 MV 抗体価の上昇、2) MV 特異的 B 細胞の増加、3) ワクチン接種至適時期の設定とする。

B. 対象と方法

対象：自家あるいは同種 HCT 後 2 年未満の患者、あるいは、移植後 2 年以上であっても免疫抑制剤を投与中であるなど通常の麻疹生ワクチンの接種が困難である患者を対象とする。

MV-DC ワクチンの作成：MV 感染 DC を自己 DC に貪食させることにより、抗 MV-DC ワクチンを作成する。UV 照射によりアポトーシスに陥った被感染細胞からウイルス抗原を認識した DC は、自己 T 細胞にウイルス抗原を提示する能力を獲得し、抗ウイルス免疫を惹起する。

MV-DC ワクチンの接種方法：上腕あるいは大腿皮下に 1 回接種する。第 I 相臨床試験は 3+3 デザインにより実施する。1 回あたりの接種細胞数は、 $2 \times 10^5$  (コホート 1) より開始し、安全性の確認とともに、 $1 \times 10^6$  (コホート 2)、 $5 \times 10^6$  (コホート 3) に dose up する。

安全対策：1) GMP グレードの試薬、器具、設備を使用する。2) 調整したワクチンに微生物が含まれないことを細菌・真菌 PCR で確認するとともに、エンドトキシンを測定する。3) 標準作業手順書 SOP を作成し、これを遵守する。

安全性の確認：1) CTCAE ver3.0 に基づいて副反応を、接種後 24 時間および 6 週後に評価する。2) 特に、発熱、発疹、リンパ節腫脹などの全身症状、接種部位の発赤、腫脹、熱感の発生に留意する。

有効性の評価：1) ワクチン接種前と接種後 6 週の血清 MV 抗体価を EIA 法と HI 法にて評価する。これらの検査は SRL に依頼する。2) MV 特異的 B 細胞の測定：接種前後の末梢血から分離した B 細胞を CD40、SAC lysate、PWM、LPS、CpG、IL-2、IL-6、IL10 の存在下で培養する。これらの刺激により、抗 MV 抗体をはじめ、ムンプスウイルス、風疹ウイルスなど、種々のウイルスに対する抗体産生が誘導される。培養上清中に含まれる抗 MV 抗体価を ELISA 法で測定する。

ワクチン接種至適時期の設定：HCT 後の患者の CD45 陽性、CD62L 陽性、CD11a 陰性 T 細胞 (true naive T 細胞) 数を、flow cytometry 法を用いて測定する。また、T cell repertoire を Spectratyping にて検討する。

### C. 研究結果

平成 22 年 2 月 12 日までに 5 例 (コホート 1 : 3 例、コホート 2 : 2 例) の HCT 患者に MV-DC ワクチンを接種した (表 1)。5 例すべてにおいて接種後 24 時間の有害事象を認めず (図 1)、また、評価可能であった 4 例において接種後 6 週までに有害事象を認めなかった。なお、作製した DC ワクチンすべてにおいて、細菌・真菌は PCR 法で検出されず、また、エンドトキシンも陰性

表 1 対象患者

| 症例 | 診断         | 移植後 | ドナー          | 慢性 GVHD | 免疫抑制剤 | DCワクチン投与細胞数          |
|----|------------|-----|--------------|---------|-------|----------------------|
| 1  | infant-ALL | 15M | Unrelated BM | -       | -     | 2 x 10 <sup>5</sup>  |
| 2  | T-ALL      | 27M | Double CB    | -       | -     | 2 x 10 <sup>5</sup>  |
| 3  | NB         | 29M | Auto BM      | -       | -     | 2 x 10 <sup>5</sup>  |
| 4  | AA         | 12M | Unrelated BM | -       | FK506 | 10 x 10 <sup>5</sup> |
| 5  | Ph1-ALL    | 14M | Unrelated BM | -       | -     | 10 x 10 <sup>5</sup> |
| 6  | AML        | 10Y | Related BM   | +       | FK506 | 2月18日                |

であった。

血清 MV 抗体価、および、麻疹特異的 B 細胞は、現在、コホート 1 の 3 例について評価した。HI 法では血清 MV 抗体価の上昇を認めなかったが、3 例中 2 例において EIA 法で抗体価の陽転を認めた (表 2)。また、3 例すべてにおいて麻疹特異的 B 細胞の増加を認めた (図 2)。

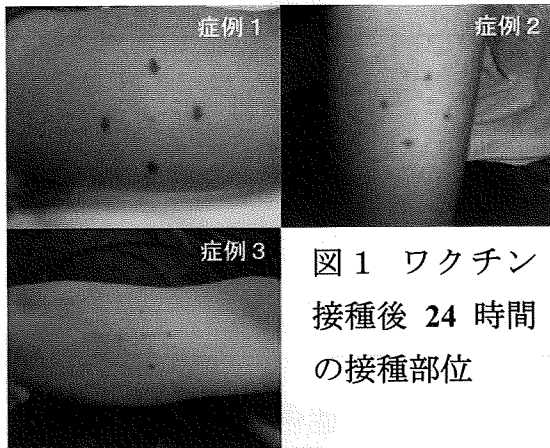


図1 ワクチン接種後 24 時間の接種部位

表2 血清 MV 抗体価

| 症例   | コホート | HI  |      | ELISA |      |
|------|------|-----|------|-------|------|
|      |      | Pre | Post | Pre   | Post |
| 1    | 1    | <8  | <8   | <2.0  | 3.2  |
| 2    | 1    | <8  | <8   | <2.0  | 2    |
| 3    | 1    | <8  | <8   | <2.0  | <2.0 |
| 4    | 2    |     |      |       |      |
| 5    | 2    |     |      |       |      |
| 6    | 2    |     |      |       |      |
| 健康成人 | 1    | 8   | 8    | 30.7  | 33.8 |

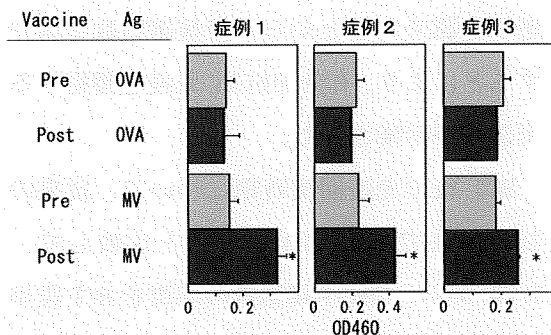


図2 MV 特異的 B 細胞

対象患者 4 例を含む HCT 後患者 34 例の

True naive T 細胞数と CD4/CD8 比を測定した。True naive T 細胞数は、CD4/CD8 比と

表3 True naive T cell

| 症例 | コホート | WBC   | TN-CD4 | TN-CD8 |
|----|------|-------|--------|--------|
| 1  | 1    | 17450 | 1106   | 624    |
| 2  | 1    | 7240  | 139    | 130    |
| 3  | 1    | 7600  | 328    | 362    |
| 4  | 2    | 5990  | 190    | 138    |
| 5  | 2    |       |        |        |
| 6  | 2    |       |        |        |

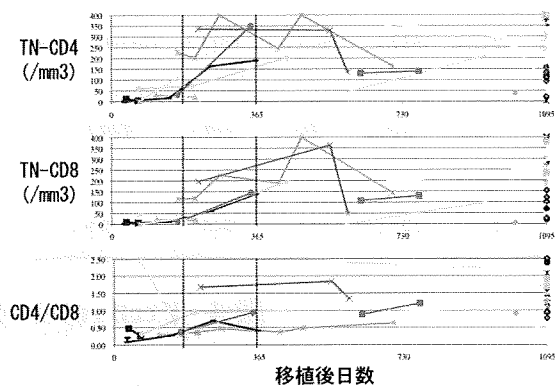


図3 HCT 後患者の True naive T cell、CD4/CD8 比の経時的変化

比較して、HCT 後早期に回復する傾向にあった(表3、図3)。また、ワクチン接種直前の末梢血 T cell repertoire の検討では、spectra typing におけるピーク数は 7.0-11.5 であった(図4、表4)。

D. 考察

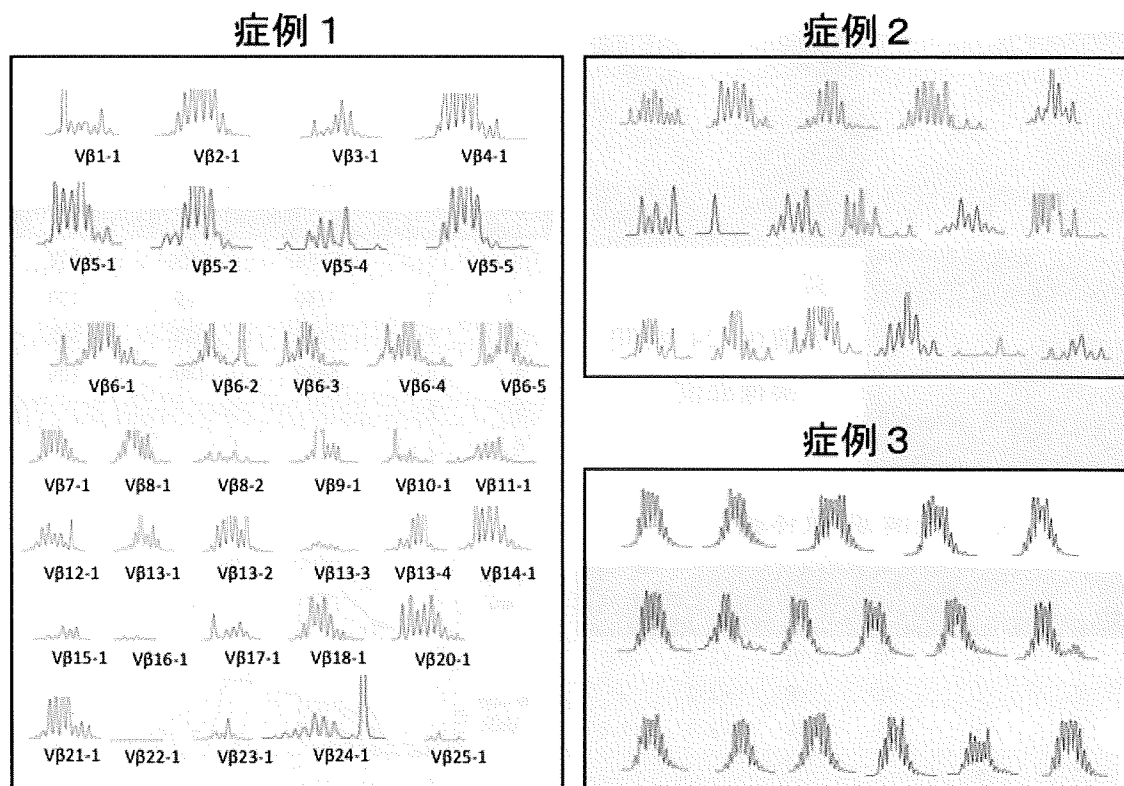


図 4 T cell repertoire (Spectratyping)

抗 MV-DC ワクチンを HCT 後患者 5 例に接種したが、特に副反応を認めず、安全であることが予測された。有効性については、コホート 1 では MV 感染に対する十分な血

と、3 例すべてにおいて MV 特異的 B 細胞の増加を認めたことから、接種細胞数を増やすことにより、有効な抗 MV 免疫を獲得する可能性が示唆された。

| 症例 | コホート | ピーク数 |
|----|------|------|
| 1  | 1    | 9.4  |
| 2  | 1    | 7.0  |
| 3  | 1    | 11.5 |
| 4  | 2    | 10.0 |
| 5  | 2    |      |
| 6  | 2    |      |

表 4 T cell repertoire

清 MV 抗体価の上昇を認めなかったが、EIA 法で 3 例中 2 例に抗体価の陽転を認めたこ

HCT 後の免疫回復時期について、従来の判定方法である CD4/CD8 比と比較して、True naive CD4 T 細胞数の回復を HCT 後早期に認める傾向にあり、これが HCT 後免疫回復時期を判定する指標となりうる可能性が示唆された。

#### E. 結論

MV-DC ワクチンが安全である可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yufeng Li, Lei Qi, Iwao a, E Azuma E,  
et al. Alternative Fas-mediated cell  
death pathway is dependent on the dierent  
cleavage patterns of procaspase-8. Mol  
Cell Biochem 331:231-238, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし



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

臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究  
研究課題: 小児臍帯血移植におけるシクロスポリン至適使用法の検討(3時間点滴の TDM)  
研究分担者 足立 壮一(京都大学大学院医学研究科人間健康科学・教授)

研究要旨

造血細胞移植において免疫抑制剤のシクロスポリンの標準的投与方法は未だ確立していない。しかし、ネオオーラル®(シクロスポリン内服薬)が導入されてからは、ネオオーラル®の薬物動態と効果およびシクロスポリンの薬理作用が検討され AUC<sub>0-4</sub>, C<sub>2</sub> 値(内服 2 時間後の血中濃度)および C<sub>max</sub> が効果に相関することが明らかになった。そこで、小児臍帯血移植でのシクロスポリン 3 時間点滴における C<sub>3</sub> 値を設定してシクロスポリンの体内薬物動態を検討する治療研究を開始した。

A. 研究目的

造血幹細胞移植においてシクロスポリン(CyA)の目標血中濃度、至適使用量および点滴方法等 CyA の使用方法は各施設の経験に基づき行なわれている。小児の移植においては、京都大学小児科からパイロット試験で、3 時間点滴法の有用性と点滴時の C<sub>3</sub> 値(CyA 投与後 3 時間の血中濃度)や内服時の C<sub>2</sub> 値の検討について報告がある。そこで、これまでの報告やパイロット試験などを参考にして、3 時間点滴における目標 C<sub>3</sub> 値を設定して CyA の体内薬物動態を多施設にて検討する。

B. 研究方法

小児臍帯血移植において GVHD 予防として、CyA 注射液(CyA-IV;サンディミュン®注射液)を 1.5mg/kg の 3 時間点滴で 1 日 2 回行ない、投与後 3 時間値(C<sub>3</sub> 値)を目標値として投与量を調節する。CyA の体内薬物動態を検討し、CyA の標準的投与方法を確立する。Day29以降に、1日点滴量の 2 倍の経口剤ネオオーラル®(CyA-MEPC)1日2回内服に切り替えて、同様の検討をする。また、同時に急性 GVHD 発症の有無について検討する。

用量調節

Day3 に血中濃度を測定し、用量調節を行う。血中濃度の目標値は、C<sub>3</sub> 値が、800ng/ml を下回らず、1500ng/ml を超えないようにする。トラフ値(C<sub>0</sub> 値)が、300ng/ml を上回った場合は、副作用が発現しない限り継続する。経口摂取が可能になった場合は、注射投与量の倍量の CyA-MEPC に変更し、血中濃度を測定する。

用量調節方法

C<sub>3</sub> 値を A ng/ml として、以下の計算式に基づいて調節する。

800ng/ml を下回った場合

$$(900/A) \times (\text{現在の使用量}) = (\text{新たな使用量})$$

1,500ng/ml を上回った場合

$$(1,400/A) \times (\text{現在の使用量}) = (\text{新たな使用量})$$

(評価項目)

以下の項目について検討する

主要評価項目: CyA の体内薬物動態の検討

副次的評価項目: 移植後 50 日間の急性 GVHD の発生率、急性 GVHD および腎障害と CyA 血中濃度(C<sub>3</sub> 値, C<sub>2</sub> 値, C<sub>0</sub> 値)の関係、安全性(副作用)

(予定登録数と登録期間)

登録期間：2年

追跡期間：1年

研究期間：3年

(研究組織、参加施設と登録)

総括責任医師：

京都大学大学院医学研究科人間健康科学  
足立 壮一

研究事務局：

京都大学大学院医学研究科発達小児科学  
松原 央

研究参加施設

当該研究に対する参加募集を行っており、  
小児造血細胞移植を行なっている施設から以  
下の6施設の参加表明があった。

- 京都大学医学部附属病院
- 福井大学医学部附属病院
- 神戸中央市民病院
- 京都桂病院
- 松下記念病院
- 京都市立病院

倫理面への配慮

本試験を施行するにあたり、京都大学の倫理  
委員会の承認を得た。また各参加施設にも施  
設内の倫理委員会の承認を得て実施している。  
対象患者の個人情報とは特定されないように厳  
格な配慮をし、その情報管理は厳密に取り扱  
うものとした。

C. 研究結果

登録予定数は10例。研究開始1年6ヶ月  
が経過し、2010年1月末時点で4例の登録が  
あった。現在も登録受付を継続中である。

D. 考察

本研究を開始する以前に当科で検討した臍  
帯血移植10例に対するCsAの3時間点滴静  
注法では、以下の結果が得られている。

□C3値がAUC<sub>0-12</sub>、AUC<sub>0-6</sub>に強い相関を示し  
た。□移植後早期は、用量を調節した後でも  
目標C3値である800ng/ml以上に達しない例  
が多かった。□急性GVHD(Grade II)の発  
症を3例に認めたが、いずれも皮膚のみであ  
った。□内服変更後も3時間点滴法と同様の  
動態を示した。□CsAによる重篤な腎障害、脳  
症などは認めなかった。

これらの結果を基に、多施設での安全かつ有  
効な結果が得られるかの検討が必要である。

E. 結論

少数例の検討だが、シクロスポリン3時間  
点滴静注法にて目標血中濃度に到達させるこ  
とで、重篤なGVHD、腎毒性、神経毒性はお  
こさず有効な結果が得られると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表  
予定あり
2. 学会発表  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
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

臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究  
研究課題 臍帯血移植臨床研究の管理と統計学的解析

研究分担者 熱田 由子 (名古屋大学大学院医学系研究科 造血細胞移植情報管理・生物統計学・助教)

研究要旨

日本国内における造血幹細胞移植患者情報をより正確に、迅速に把握するためのシステムおよびツールをつくることを目的とし、4つの登録（日本造血細胞移植学会、日本小児血液学会、骨髄移植推進財団、日本さい帯血バンクネットワーク）が協力して2006年から造血細胞移植登録の一元化・電子化がなされたが、このシステムを用いた臨床試験への応用と、臍帯血移植臨床試験のデータ管理の質の向上を研究課題とした。臍帯血移植臨床試験では、TRUMP 調査項目を電子データで、TRUMP 調査項目以外の項目を紙調査票で収集する方法を取り、収集患者情報の質の向上と同時に登録施設の負担を軽減する工夫を行った。臍帯血移植臨床試験データ管理では、試験進捗管理・患者情報データ管理で各種手順書を作成し、手順に従ったデータ管理を行うことにより合理的に質の高いデータ管理を実施した。試験参加医師を主な対象として、臨床試験におけるデータ品質管理・品質保証の意義およびその方法を解説するという教育を実施した。

A. 研究目的

臍帯血移植臨床研究（前向き臨床試験を含む）の質の向上を目的とし、以下の4点に重点をおいた活動をおこなった。

A-1. 造血細胞移植登録プログラム (TRUMP) を用いた一元化登録の推進と TRUMP の臨床試験への応用。

2006年から開始した本邦における造血細胞移植登録の電子化・一元化登録の推進は、本邦における造血幹細胞移植実施状態の把握における貢献のみならず、その成績を明らかとする登録研究(registry study)において、その質の向上に多大な貢献が期待される。一方、2007年1月に行われた施設アンケートから、登録や臨床試験の症例報告書の記入において医師のみが担当している施設が回答した136施設中109施設(80%)、医師+事務担当者の施設が11施設(8%)と、約9割の施設において医師が登録や症例報告書記入の担当の中心となっており、専属CRCやデータマネージャーなど専門のスタッフがいる施設は9施設(7%)にとどまっていることが判明しており、登録施設の負担を最大限に考慮する必要がある。臍帯血移植を含む造血幹細胞移植臨床試験においては、大抵の場合、

TRUMP 調査項目は基本項目として調査対象となる。そのため、同じ移植症例において、同じ項目を重複して入力・記載する必要のない体制を整えることは重要であり、TRUMP の臨床試験への応用は一つの解決策となる。

A-2. 臍帯血移植臨床試験におけるデータ管理の質の向上。

2009年度は本研究班において計画された以下の2つの臨床試験におけるデータ管理を担当し、管理データの質の向上に努めた。臨床試験より導き出される結論は、実地臨床をささえるエビデンスとなるため、収集・解析される臨床情報が正確に処理されることが倫理的・科学的見地より重要である。

- 複数臍帯血同時移植の臨床第II相試験
- 成人における骨髄破壊的前処置による非血縁者間臍帯血移植の移植方法に関する研究  
(東京大学医科学研究所附属病院の移植法を用いた多施設第II相臨床試験)

A-3. 試験参加医師を対象とした教育

A-2で記載したデータ管理の質の向上は、臨床試験

登録患者の臨床情報管理におけるエラーを最小限にし、臨床試験から導き出される結論の正しさをできる限り保障しようという目的のためである。しかしながら、臨床現場の医師は臨床試験参加患者管理だけではなく、膨大な量の日常臨床業務を担っており、データセンターからの督促や未記入データなどの問い合わせの意義が十分に理解されていないことが多い。試験参加医師を主な対象として、臨床試験におけるデータ品質管理・品質保証の意義およびその方法を教育し、同時に臨床医からの意見をもとにデータの提出方法の再検討も実施する。

#### A-4. 海外の移植登録組織の情報収集

欧 (the European Group of Blood and Marrow Transplantation)、米 (Center for International Blood & Marrow Transplant Research)、そして亜 (Asia-Pacific Blood and Marrow Transplantation Group) らが参加する Worldwide Network of Blood and Marrow Transplantation (WBMT) では、全世界での造血幹細胞移植の実施状況や組織間の共同研究実施のインフラを整えていくための活動を開始している。その会議に参加し、より共同研究が実施しやすい状況に我が国の移植データベースも構築していく。(参加会議は2010年3月22日に予定している)

### B. 研究方法

#### B-1. TRUMP による一元化・電子化登録の推進

##### 1. TRUMP 項目の調整

TRUMP は2004年から2年間をかけて開発され、当時独立して移植データを収集していた4組織(日本小児血液学会、骨髄移植推進財団、日本さい帯血バンクネットワーク、および日本造血細胞移植学会)の調査項目を融合させ、TRUMP 調査項目が作成された。2008年度の TRUMP version up では、欧米の造血幹細胞移植基本調査項目を網羅するような調査項目の変更を行った。

##### 2. TRUMP の臨床試験への応用

TRUMP は施設内のインターネットに接続していないコンピューターで管理されるコンピューターベースのプログラム(ソフトウェア)である。施設内では、患者氏名や患者生年月日などの個人識別情報を用いて管理し、学会あるいはバンクへの提出データファイルはワンクリックでコンピューター上に登録用の匿名化・暗号化ファイルが保存される。この書き出し機能

には、学会登録用のすべての症例を対象とした書き出し機能と、個々の症例を対象とした書き出し機能が存在する。後者の書き出し機能を用いて、臨床試験における患者基本・臨床情報の収集の効率化および質の向上を図った。具体的には、患者情報の収集を TRUMP データ(電子データ)および TRUMP 調査項目以外の臨床試験収集データに分け、後者に限り紙調査票で患者情報収集を行う方法とした。

#### B-2. 臍帯血移植臨床試験におけるデータ管理

##### 1. プロトコールレビュー

研究者が執筆したプロトコールをレビューし、データ管理観点、統計学的観点、臨床試験方法論観点から試験計画案の改善に寄与した。

##### 2. 調査票の作成

TRUMP 調査項目以外の収集項目を対象とした紙調査票を設計した。記入ミスが少ないようにチェック形式の項目をベースとし、自由記載欄はできる限り縮小した。

##### 3. 患者登録・進捗管理

登録患者の試験遂行が滞りなく行われ、必要な患者情報が滞りなく収集される体制を構築するために、患者登録・進捗管理においては別途手順書を作成し、情報収集のタイミングに担当医師に電子メールで通知し、報告データ(電子および紙媒体)の提出が遅れた場合にはやはり電子メールで督促を行えるような進捗管理プログラムを試験ごとに作成した。

##### 4. 有害事象報告時の対応

有害事象が発生した際に速やかに研究代表者に報告がなされ、研究代表者および効果安全性評価委員会との合議のもと該当事象に対する対応を決定するまでの一連の流れを滞りなく管理できるような手順書を作成した。

##### 5. データの入力・チェック・問い合わせ

TRUMP 入力データに関しては、TRUMP の論理チェック機能によるデータチェックを施行し、紙調査票データにおいてはダブルエントリー法での入力を行う。未記入データや矛盾データなどは問い合わせの対象となる。

##### 4. モニタリング

データセンター内で報告データの確認を行うセントラルモニタリングを施行した。登録・進捗状況の確認、逸脱症例の検討、試験安全性情報の確認をモニタリングにおける確認項目とした。