

**Characteristics of CD4 T cells expanded from cord blood**

政策創薬総合研究:「脐帯血DLIの実用化と細胞治療剤の医薬品化へ向けてのトランスレーショナルリサーチ」(藤原成悦班)

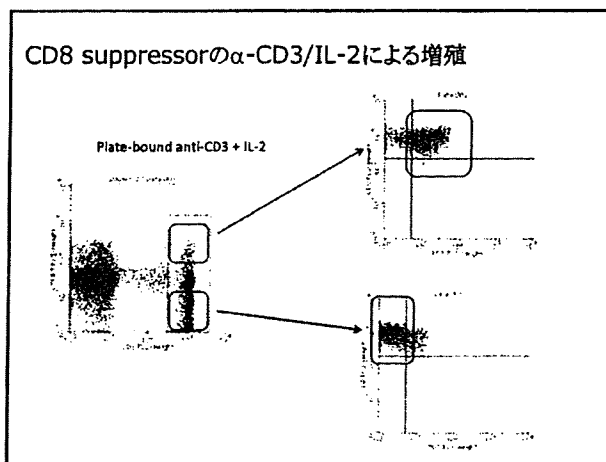
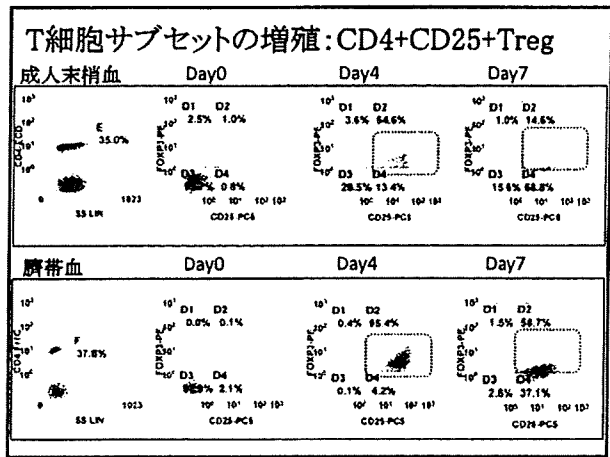
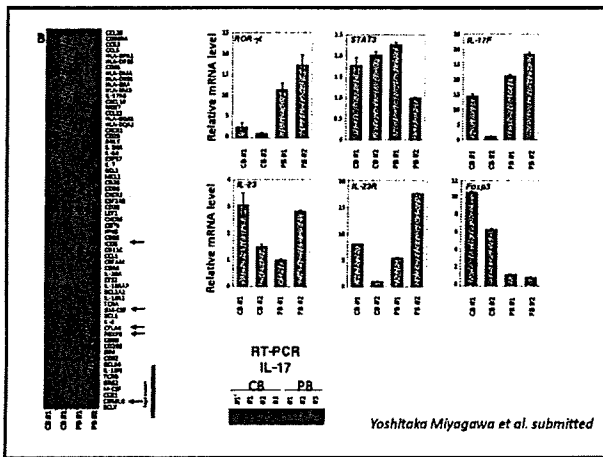
**Cytokine production**

IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ : comparable to adult peripheral blood (APB)

**Gene expression profiling of expanded CB T-cells**

CB>APB FoxP3, CD40L, CD70, 4-1BB, RANKL, TRAIL, CD38

CB<APB IL-7, IL-17, IL-6R, IL-7R, ROR $\gamma$



**検討課題**

- ・ヒト骨髄内骨髄移植後生着促進に寄与するT細胞サブセットの同定
- ・無血清培養を含む至適培養方法の確立 ( $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 vs  $\alpha$ CD3/IL-2)

## 5. 「選択的移植片対腫瘍反応の誘導－マイナー抗原ワクチンの臨床研究」

赤塚美樹・鳥飼宏基

(愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部)

### 1. マイナー抗原ワクチン臨床試験

固形癌に対するペプチドワクチンは欧米および国内で十年以上臨床試験・研究で投与されてきたが、本年度になって医薬品化に向けた治験も開始されつつあり、ペプチドワクチンに対する評価体制ができつつある。

マイナー抗原ワクチン臨床試験の現状：過去2年で、56症例がマイナー抗原 (mHag) タイピングを受け、うち34例がドナーとペアでタイピングを受けた。9ペアで現在準備の済んでいる mHag ペプチドである ACC-1<sup>Y</sup>, ACC-1<sup>C</sup> (HLA-A\*2402), ACC-2 (HLA-B\*4403/B\*4402), HA-1 (HLA-A\*0201/A\*0206) いずれかの mHag で GVL 方向の不適合を認めた。これらのうち、再発例と再発ハイリスク例について、1例ずつ実際にワクチンの投与がなされた。

1例目は自家移植後の PTCL-u の第一再発時に HLA-DR 血清1座不一致非血縁移植を受けたものの、13カ月後に右鼠経部に腫瘤として再発した男性。局所照射と VP-16 内服で再寛解導入中に ACC-1<sup>C</sup> mHag に GVL 方向に不適合があることが判明し、当院へ紹介となった。「治療投与」適格と判定されたため、30 $\mu$ g の ACC-1<sup>C</sup> ペプチドをモンタナイド ISA51VG アジュバントとともに隔週で皮下接種を行った。3回接種時点で右鼠経腫瘤が PD となったため投与を中止した。有害事象として、3回目のワクチン接種局所に7cm大の発赤と硬結を認めたが自然消退した。末梢血のテトラマー及び ELISPOT 検査ではワクチン前、ワクチン後ともに ACC-1<sup>C</sup> 特異的 CTL は検出されなかった。

2例目は T-ALL/LBL の第一寛解期に HLA 一致同胞間移植を受けた男性で、HLA-A\*0206 拘束性の HA-1<sup>H</sup> mHag に GVL 方向に不適合があり、再発ハイリスク症例であったため当院へ紹介となった。「再発予防投与」適格と判定されたため、30 $\mu$ g の HA-1<sup>H</sup> ペプチドをモンタナイド ISA51VG アジュバントとともに隔週で皮下接種を行った。予定の5回の接種を終了した。有害事象として、4回目以降のワクチン接種局所に5cm大の発赤と硬結を認めただけでいずれも1週間程度で自然消退した。末梢血のテトラマー及び ELISPOT 検査については現在検討中である。

いずれの症例も有害事象は局所反応だけであり、今後、2例目の mHag 特異的免疫反応の誘導状況の結果によって初回投与量が不十分と考えられれば、投与量・スケジュールを変更すべきか効果安全評価委員会と検討する予定である。また、拘束性 HLA の存在に加え、mHag の GVL 方向不適合がある症例は20%程度であるので、今後さらなる症例のリクルートを行っていく。

さらに、我々はセントラルメモリー形質をもつ ACC-1<sup>Y</sup> 特異的 CTL が末梢血より骨髄中により多く存在することを過去に報告しており、今後機会があれば骨髄中の CTL の増減を検討する他、現行のワクチンの安全性が確認できた後は、ペプチドを添加した樹状細胞を皮下接種ないしは骨髄内投与する可能性について検討する予定である。

### 2. マイナー抗原特異的 CTL の骨髄へのホーミング法の検討

上述のように骨髄は確かにセントラルメモリー T 細胞のリザーバーとして、また残存白血球細胞の存続の場所として、ともに樹状細胞ワクチンを投与する理想的な場所である可

能性がある。しかしながら、ワクチンを骨髄内に（特に再発予防投与として）反復投与する際の合併症も無視できない。そこで SDF-1/CXCL12 を分泌する骨髄へのホーミングレセプターである CXCR4 を、CTL の効率的な骨髄への送達に利用できないか検討を開始した。

マウスと人の CXCR4 はアミノ酸レベルで 89% 相同であることから、まず CXCR4 高発現ヒト骨髄腫細胞株がマウス骨髄に集積しうるか検討した。細胞株にルシフェラーゼ遺伝子を導入し安定株を得た後、8 週齢の NOG マウスの尾静脈から  $1 \times 10^7$  個を投与し経過観察した。6 週目の時点でも末梢血中には骨髄腫細胞が認められなかったため屠殺し、骨髄・脾臓への浸潤をフローサイトメトリー（抗ヒト CD45、CD38 抗体を指標）で検討したところ、骨髄への選択的な生着が認められた。またルシフェラーゼの発光でも同様の傾向が認められた。

以上の予備的結果より、CXCR4-IRES-GFP のコンストラクトをレトロウイルスにてマイナー抗原特異的 CTL に導入し、養子移入を試みた。GFP を指標とした場合、CTL への遺伝子導入効率は 80% 程度と良好であった。実際にこの CTL とマイクロチャンバーを隔てて SDF1  $\alpha$  濃度勾配を用いた chemotaxis assay を行ったところ、CXCR4 導入細胞で有意な migration が認められた（約 80% vs. 約 35%、単回実験）。

今後 CXCR4 導入 mHag 特異的 CTL またはコントロール CTL を NOG マウスの尾静脈から投与し、骨髄へのホーミング、事前に生着させておいた腫瘍細胞への抗腫瘍効果について検討する予定である。

## 6. 「灌流法により採取された骨髄細胞を用いた、骨髄内骨髄移植療法（HLA 不適合移植）」 臨床試験プロトコル案

兵庫医科大学 血液内科  
吉原 哲、小川 啓恭

灌流法による骨髄採取+骨髄内骨髄移植の有用性については、動物モデルにおいては多数のデータにより示されている。しかしながら、ヒトにおける臨床応用は中国で 1 例行われたのみであり、進んでいない。現在、自家移植の系において、灌流法による骨髄採取の安全性を検討する臨床試験が行われている。本臨床試験では、同種移植の系における、灌流法による骨髄採取+骨髄内骨髄移植の安全性および有効性を検討したい。

試験の目的：「灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植療法（HLA 不適合移植）」の安全性および有効性の検討（臨床第 I/II 相試験）

### 1) ドナー：灌流法による骨髄採取について評価する

主要評価項目：灌流法による骨髄採取に伴う安全性を primary endpoint とする

### 2) レシピエント

主要評価項目：第 I 相試験では、骨髄投与法（骨髄内骨髄移植）の安全性を primary endpoint とする。第 II 相試験では、移植後 100 日の時点での急性 GVHD の頻度と重症度を primary endpoint とする。

対象(レシピエント)：難治性造血器腫瘍（詳細は別に規定）

治療計画：治療計画には、ドナーに対する「灌流法による骨髄採取」と、レシピエントに対する「骨髄内骨髄移植」の 2 つの要素が含まれる。

### 1) 骨髄採取法

- ① 全身麻酔下で両腸骨から灌流法で採取する。
- ② 2 本の骨髄穿刺針を腸骨に約 3-5cm の間隔で穿刺し、生理食塩液 30 ml を一方よりゆっくり注入し、同時に対側から軽く吸引する。この時、採取側シリンジには、ヘパリン（10~30 U/ml とする）加生理食塩液を（約 0.5 ml）を含む。
- ③ 採取は、骨髄の有核細胞数  $2.0\sim 3.0 \times 10^8$  個/kg 以上の細胞数を目標として行う。ただし、 $1.0 \times 10^8$ /kg 以上の細胞数が確保できれば、骨髄内骨髄移植法による臨床試験を継続する（ $1.0 \times 10^8$ /kg の細胞数が確保できなかった場合は、本臨床試験からは脱落とし、従来の骨髄吸引法など他の方法を施行する）。

### 2) 移植前処置：Flu+BU+ATG, Flu+MEL+ATGなど

### 3) 骨髄投与法（骨髄内骨髄移植）

- ① ドナーから灌流法で採取された骨髄細胞は、バッグ遠心法により無菌的に血漿除去を行った後、約20～30mlの生理食塩水に再浮遊させる。
- ② 骨髄細胞を脛骨または腸骨の骨髄内に投与する。
  - 可能であれば、投与前にレシピエントの骨髄から約10ml～15mlの骨髄液を採取する（骨髄内への注入時の圧を減じるため）。
  - 骨髄細胞を半分ずつ2本のシリンジに分け、それぞれを左右の骨髄内に注入する。注入前には、ミダゾラム等による鎮静を行う。穿刺部に対しては、圧迫止血を行い注入した骨髄液が出血と共に漏れないように注意する。

### 4) GVHD予防

GVHD 予防法については、現在の HLA2-3 抗原不適合移植のものに準ずる（FK+mPSL1mg/kg）。

## 7. 新しい造血幹細胞移植技術（灌流法＋骨髄内骨髄移植法）の有用性 — ウサギの haploidentical BMT の系を用いて —

関西医科大学病理学第一講座  
池原 進

われわれは、これまでにマウス、ラット等の小動物を用いて、骨髄内骨髄移植法 (IBM-BMT) の有効性を明らかにしてきたが、ヒトへの応用を視野に入れて、カニクイザルを用いた大規模な研究も実施し骨髄細胞の採取法として灌流法 (Perfusion method: PM) を開発した。この PM を用いると、GvHD が予防できるだけでなく、ドナーの負担を軽減することが明らかになった。

今回、PM + IBM-BMT のヒトへの応用を目指して、haploidentical BMT の系でウサギを用いて、従来の方法との有効性を比較検討した。

### <方法>

Conventional JW rabbit (RLA は不一致) を用いて、先ず、放射線量を決定した。ウサギは、放射線に感受性が高く、6Gy × 2 (one shot とすれば 8Gy に相当) を移植前日に 6 時間間隔で  $\gamma$  セル ( $^{137}\text{Cs}$ ) を用いて照射した。予備実験で、従来の BMT の方法 [吸引法 (AM) + 静脈内骨髄移植 (IV-BMT)] では、GvHD のため、移植後 1 か月以内に全例が死亡したので、本実験では、haploidentical BMT (parent → F1) の系に IBM-BMT を用いて、AM と PM の有効性を比較した。骨髄細胞は、長管骨より、AM と PM を用いて採取した (ウサギはサルと同様で、腸骨の発達が悪いため、長管骨を用いた)。IBM-BMT には 2-5 M $\ell$  の濃厚な骨髄細胞浮遊液を長管骨 (両側の大腿骨) へ注入した。移植細胞数は  $1 \times 10^8/\text{kg}$  に統一した。

### <結果>

PM グループ (PM + IBM-BMT) と AM グループ (AM + IBM-BMT) の結果を以下にまとめた。

- 1) 造血系 (WBC 数, 血小板数等) の回復は PM グループで速やかであった。
- 2) T 細胞系 (CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>) の回復も速やかに認められた。
- 3) GvHD の発症率は AM グループでは 75% と高率であったが、PM グループでは 25% しか発症しなかった。
- 4) 移植後 365 日目の生存率は、AM グループでは 33% であったが、PM グループでは、75% と良好な結果が得られた。
- 5) 生存したウサギ (移植後 90 日目以降) の T 細胞機能検査 (mitogen response, MLR, skin grafts) では、正常な反応性を示した。

### <考察>

以上、動物の中で、アロの BMT が最も困難とされているウサギを用いて、conventional condition の下で、IBM-BMT と PM の組合せにより、haploidentical BMT に成功した。

これらのデータは、ヒトの臨床応用に向けて、明るい材料を提供してくれるものと考えられる (投稿中)。

### <共同研究者>

関西医科大学病理学第一講座  
崔 雲澤, 中村修二 他

## 加藤班プログラム

13:30 厚生労働省ご挨拶 井原 正裕様 (健康局疾病対策課臓器移植室)

13:35 研究代表者挨拶 加藤 俊一 (東海大学医学部基盤診療学系)

### <セッション1:基礎的研究>

座長 安藤 潔

13:40 麻疹 DC ワクチンによる麻疹メモリーB細胞の誘導

○熊本 忠史、東 英一 (三重大学医学部・細胞移植療法部)

13:50 造血再生を目指した分子標的薬の開発

○八幡 崇 (東海大学医学部・基盤診療学系、安藤 潔 (同・内科学系))

### <セッション2:臍帯血採取、品質管理、解析法開発>

座長 高橋 聡

14:00 臍帯血採取法の改良に関する研究

○正岡 直樹 (東京女子医科大学八千代医療センター・婦人科)

14:05 臍帯血の品質管理と評価法

○高梨 美乃子 (東京都赤十字血液センター製剤部)

14:15 FACSによるHLAミスマッチ造血細胞移植後のキリズム解析を可能にした抗HLA抗体の特徴

○渡辺 信和、高橋 聡 (東京大学医科学研究所・内科、幹細胞治療研究センター)

### <セッション3:基盤整備>

座長 磯山 恵一

14:25 TRUMPから日本さい帯血バンクネットワークへの移植データ登録方法の確立に向けて

○長村 登紀子 (東京大学医科学研究所セルプロセッシング・輸血部)

14:30 各種臨床試験のデータ管理状況の報告

○熱田 由子 (名古屋大学医学部・造血細胞移植情報管理学)

14:35 複数臍帯血移植の進捗状況

○甲斐 俊朗 (兵庫医科大学・輸血部)

14:40 東大医科研の方法による成人臍帯血移植の多施設第Ⅱ相臨床試験一進捗状況一

○田野崎 隆二 (国立がんセンター中央病院・幹細胞移植科)

### <セッション4:移植成績、臨床研究(1)>

座長 足立 壮一

14:45 臍帯血移植における真菌感染症

○加藤 剛二 (名古屋第一赤十字病院・小児科)

14:55 小児臍帯血移植におけるシロシリン3時間点滴によるGVHD予防法の検討

○松原 央、才田 聡、藤野 寿典、渡辺 健一郎、中畑 龍俊、足立 壮一  
(京都大学医学部附属病院・小児科)

15:05 ex vivo増殖臍帯血T細胞輸注療法の臨床研究

○梶原 道子、清水 則夫、森尾 友宏 (東京医科歯科大学医学部)

### <セッション5:臨床研究(2)>

座長 谷口 修一

15:15 高齢者に対する臍帯血を用いたミニ移植の試み

○内田 直之、谷口 修一 (虎の門病院血液科)

15:25 拒絶例に対するOne-day regimenを用いた緊急臍帯血移植:臨床試験の提案

○山下 剛史、中尾 眞二 (金沢大学大学院・細胞移植学)

15:35 当科における「骨髄内臍帯血ミニ移植」の経験

○岡田 昌也、吉原 哲、池亀 和博、甲斐 俊朗、小川 啓恭  
(兵庫医科大学・血液内科、輸血部)

15:45~16:00 コーヒーブレイク

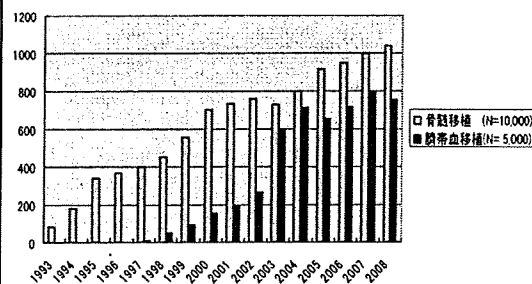


平成20年度  
厚生労働科学研究費補助金  
免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

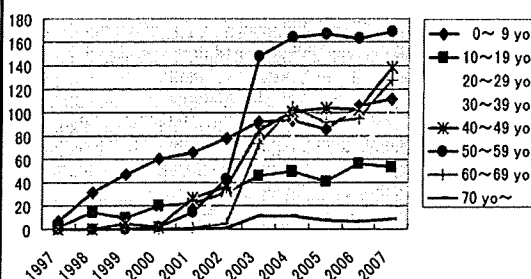
臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術  
の高度化と安全性確保に関する研究

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

### わが国における非血縁者間 骨髄移植と臍帯血移植の推移



### 年齢階層別臍帯血移植数の推移



### 研究班2期目の目標と計画(1)

臍帯血バンクに関する検討

1. 臍帯血の採取方法の検討 (正岡直樹)
  - ・臍帯血採取バッグの改良(ニプロと共同開発)
2. 臍帯血の品質管理方法の検討 (高梨美乃子)
  - ・HLA抗体と生着の関係
  - ・HLA-C抗原と白血病再発・生存との関係

基礎的検討から臨床応用へ

3. 臍帯血の骨髄内移植法の開発 (安藤 潔)
  - ・臨床研究の開始
4. 麻疹DCワクチンの開発 (東 英一)
  - ・臨床研究の開始

### 研究班2期目の目標と計画(2)

臨床研究

5. 小児における前処置の至適化 (磯山恵一)
6. 小児におけるGVHD予防法の至適化 (足立壮一)
7. 成人におけるCSTの前方視研究 (田野崎隆二)
8. 高齢者におけるRISTの前方視研究 (谷口修一)
9. 複数臍帯血移植 (甲斐俊朗)
10. 精緻なキメリズム評価法の開発 (高橋 聡)
11. 臍帯血移植におけるDLIの開発 (森尾友宏)
12. 真菌、ウイルス感染症の予防の検討 (加藤剛二)
13. 臨床研究サポートシステムの整備 (熱田由子)
14. 臍帯血移植データベースの確立 (長村登紀子)

### 研究班2期目の目標と計画(3)

特別研究:臍帯血の医薬品化に関する研究

目的:臍帯血を医薬品とすることができるかを調査研究

15. 法律、指針との整合性 (山口一成、小澤敬也)
16. GMP基準、GTP基準適用の妥当性 (山口照英)
17. 臍帯血バンク技術水準 (高梨美乃子、甲斐俊朗)
18. GMP基準細胞処理経費 (伊藤仁也、前川 平)
19. GMP基準での細胞処理の経費試算 (河原和夫)
20. 国際的な動向の調査 (川上浩司)
21. ヒト幹細胞臨床応用基準との整合性 (中畑龍俊)
22. 総括 (加藤俊一)

加藤班班会議 平成21年1月17日

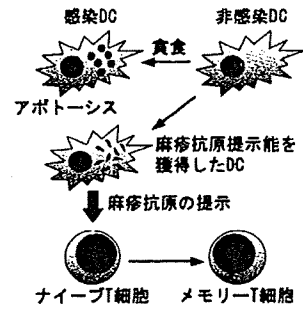
## 麻疹DCワクチンの臨床試験 (麻疹特異的B細胞の測定)

分担研究 「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」

三重大学小児科・細胞移植療法部  
藤本忠史、伊藤美津江、岩本彰太郎、平山雅浩、  
東 英一

1

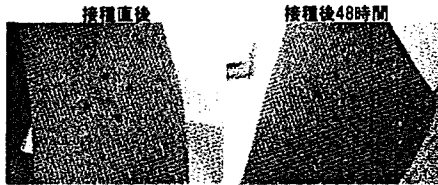
## 麻疹DCワクチン



2

## 安全性の確認 (健常成人)

MV-DCワクチン:  $1 \times 10^5$  cells 皮下注



発赤・腫脹なし。  
所属リンパ節腫脹なし。  
発熱なし。

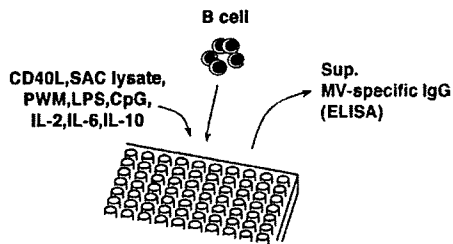
3

## 抗麻疹DCワクチンの効果 —抗体価—

	Pre	Post
EIA	30.7	33.8
HI	8	8
NT	8	4
PA	>512	>512

4

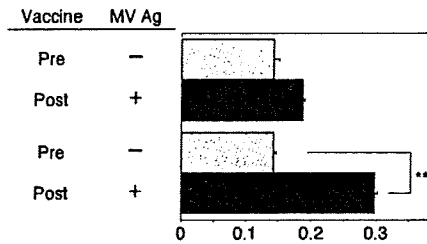
## 麻疹特異的B細胞の測定



(Amanna U, et al. *N Engl J Med*, 357;1903,2007)

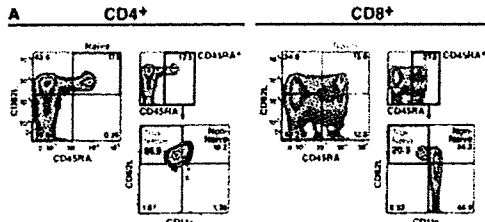
5

## 麻疹特異的B細胞の測定 —ELISA—



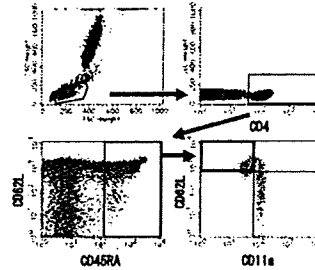
6

## Thymic outputの測定

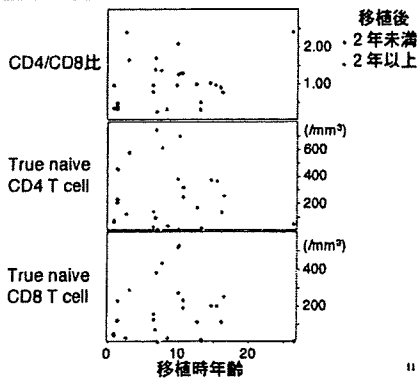
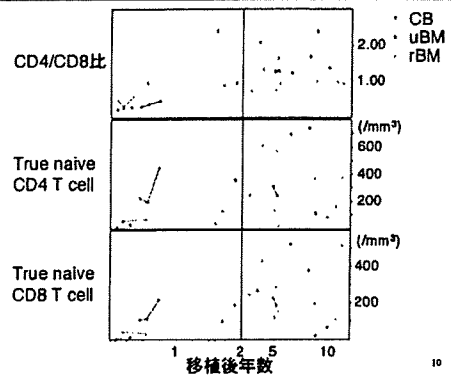
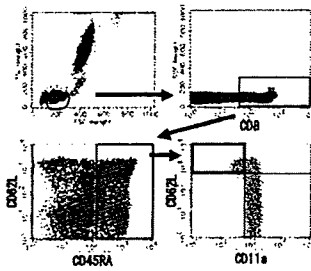


(Napoliitano, LA et al. JCI 2008; 118:1085-1098)

## True Naive CD4 T Cell



## True Naive CD8 T cell



## 結果と考案

- ・麻疹DCワクチンを健康成人に接種した。
- ・副反応はなく、安全であることが示唆された。
- ・血清抗麻疹抗体価の上昇は認めなかったが、麻疹特異的B細胞の増加を認め、接種細胞数を増やすことなどによって、より効果的となることが示唆された。
- ・移植後、末梢血CD4/CD8比が十分高値であっても、True naive T cellの絶対数が少ない例を認めた。このような症例では有効な免疫反応が誘導できない可能性がある。

## 造血再生を目指した分子標的薬の開発

○八幡 崇（東海大学医学部・基盤診療学系）、安藤 潔（同・内科学系）

造血幹細胞（HSC）は個体の一生にわたって骨髄内のニッチと呼ばれる特殊な低酸素環境下で自己複製的細胞分裂を行うことにより、幹細胞プールを維持すると同時に、分化型の機能細胞を産生することにより、造血系の恒常性を維持している。しかし、白血病などの難治性血液疾患に施行される骨髄移植においては、移植されたHSCは盛んな増殖反応を伴う造血再生を行わなければならない、HSCにとって大きな負担となるものである。このHSCの過度の細胞分裂は細胞内酸化ストレスの蓄積などを誘導し、自己複製能の低下、すなわち、幹細胞の寿命短縮を引き起こし、最終的には組織再生機構の破綻に至る危険性が增大する。さらに、骨髄移植の前処置としての放射線照射や抗癌剤投与を行うことによって、骨髄内微小血管網の破壊といったニッチ傷害が誘導され、造血再生反応が抑制される。この事実は、造血回復が遅延する傾向が強い臍帯血移植においては特に重要な問題である。したがって、より安全で有効な臍帯血移植法を確立するためには、幹細胞のみを標的とするのではなく、幹細胞が再生反応を行う環境をも対象とした再生を促進することによって組織全体の速やかな回復を促し、その再生反応に伴う幹細胞の自己複製能の低下を極力抑制する方法を開発することが重要である。

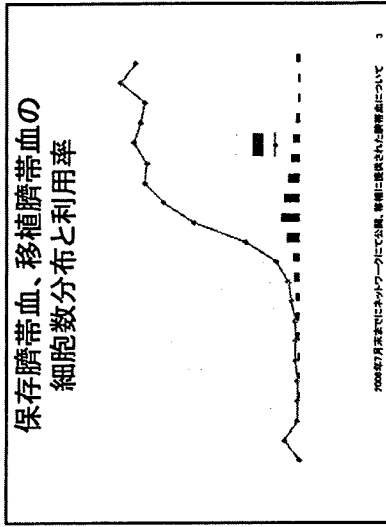
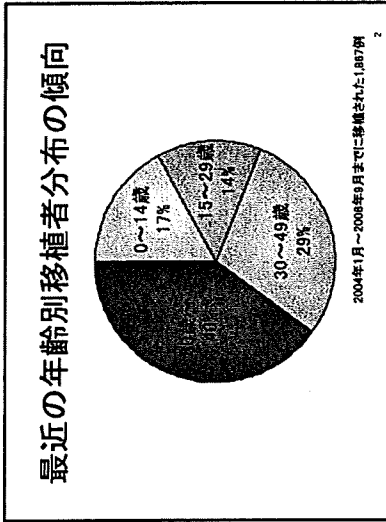
我々はヒト化マウスモデルを用いて、骨髄再生に重要な役割を果たす線溶系分子群の発現を制御する新規ニッチ再生化合物を投与することによる造血再生反応に及ぼす影響を検討した。その結果、新規化合物を投与することにより、線溶系関連分子および各種造血因子の発現が亢進し、造血系の速やかな回復と長期造血再生能の維持が実現することが確認された。すなわち、新規分子標的薬によるニッチの再生促進・改善という新しいコンセプトに基づく再生医療法の確立を試みたので報告する。

平成20年度厚生労働省科学研究 免疫アレルギー一係研究予防・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保障に関する研究」  
 研究代表者：加藤俊一(東海大学教授)

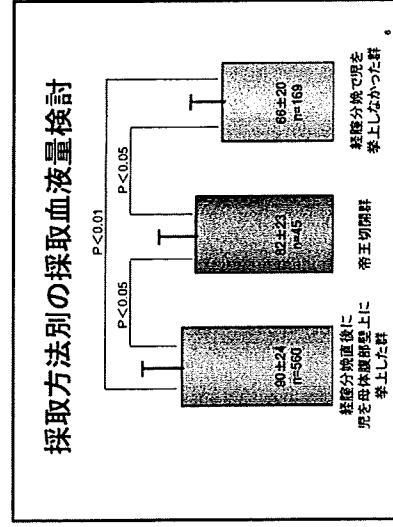
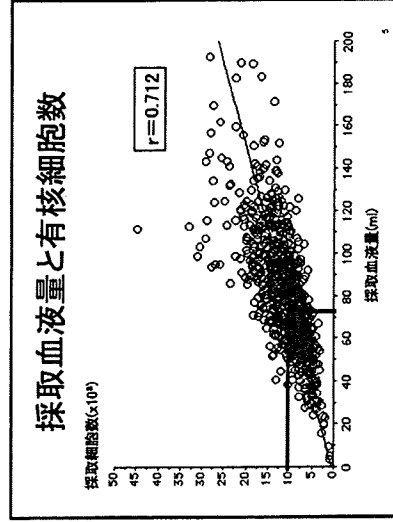
**臍帯血採取法の改良に関する研究**

分担研究者  
 日本大学医学部産婦人科学系産婦人科分野  
 正岡直樹

1



- 保存さい帯血の有核細胞数**
- 保存最低限の細胞数(2003年春変更後)  
 $3 \times 10^8$ 個以上  $\Rightarrow 6 \times 10^8$ (6億)個以上  
 \* 体重15kg  $\Rightarrow$  30kg以上の患者に移植できる
  - 移植に必要な細胞数  
 $2 \times 10^7$ 個/kg以上(患者体重あたり)  
 \* 体重50kgの成人患者では $10 \times 10^8$ (10億)個以上が必要
- 4



### 採取方法別の細菌陽性率

細菌陽性率	
1回穿刺群 (n=450)	2.2%
複数回数穿刺群 (n=176)	11.0%
P<0.0001	

### 臍帯血採取増加のための工夫

1. 分娩直後に新生児を母腹の臍部にのせる(カンガルーケア)。
2. 新生児をおく分娩補助台の高さは、できるだけ母親に近い高さとする。
3. 分娩後、できるだけ速やかに臍帯クランプを行う。
4. 臍帯穿刺は可及的速やかに行う。そのとき空気の混入を避ける。
5. 臍帯血管が虚脱しないよう連続的にゆるやかに動かしつつ採取する。
6. 穿刺は1回を原則とする。
7. 徐々に胎盤を娩出し、娩出した胎盤を手で軽く圧迫する。
8. 採血バックは床の高さにおき、凝血を防ぐため、ゆるやかに動かす。
9. 粘り強く数回の1滴まで採取する。
10. 採取になれた少人数の医師で行うと、採取量は増加する。

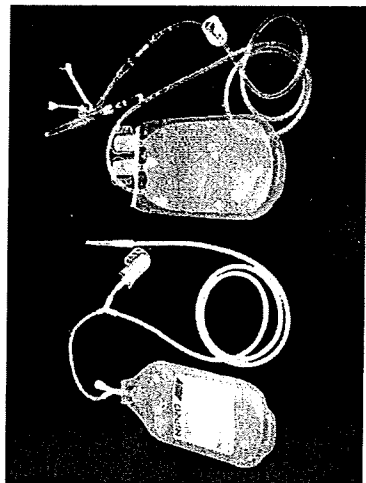
有核細胞数が多く、かつ無菌の臍帯血を得るためには、新生児を母体の臍部に挙上してから、複数回穿刺を避けて採取すること、および採取に慣れた少人数の医師で、可及的速やかに行うことが良いと考えられた。



平成20年度からの新しい試み

### 新型臍帯血採取バックの特徴

1. 留置針がソフトなものとなり、採取中に臍帯を穿通したり、針刺し事故を防止できる。
2. 針先が多孔性になっており、血液採取の効率化が期待できる。
3. 付属の留置針を固定する器具を使用することによって、両手が自由となり、臍帯を扱うことが容易となる。



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

第2回会議 2009年1月17日

臍帯血の品質管理と評価

東京都赤十字血液センター  
高梨 美乃子

臍帯血バンク検査標準化

- (1) 再現性検討 NWとしては終了、各バンクでの教育訓練の一環
- (2) 凍結検体配布による多施設比較試験 継続、第3回目を施行した
- (3) 無菌検査法 最終産物を補完する為に新基準を提案する
- (4) 臍帯血の品質基準 ? Colony assayの考え方 CD34, CFU-GM最低基準を提案
- (5) recipient抗HLA抗体

臍帯血バンク 調製保存 標準化

- (1) 採取後保管時間と温度 継続  
原材料の条件 時間が経てば品質は劣化する
- (2) 調製保存手技の統一  
赤血球除去、buffy coat濃縮の手技  
効率のvalidation  
凍結融解後の回収率のvalidation  
細胞数計算方法の統一  
標準作業手順書SOP作成：NW技術部会

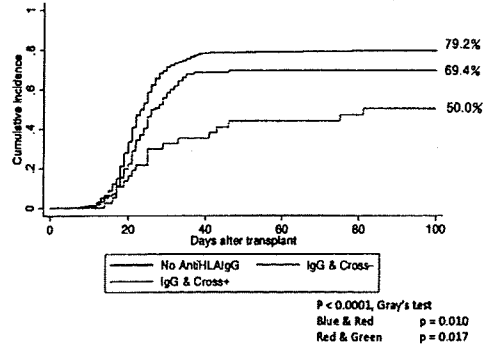
患者抗HLA抗体についての解析、初回単一臍帯血移植の648例

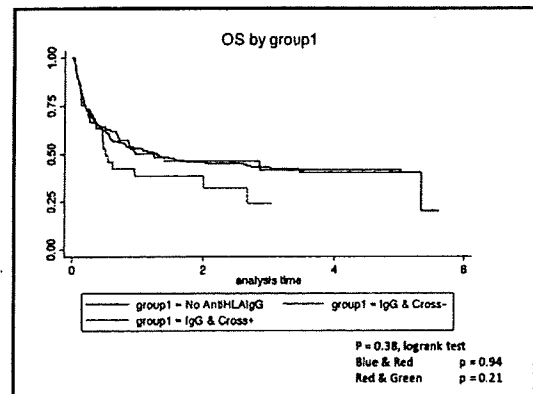
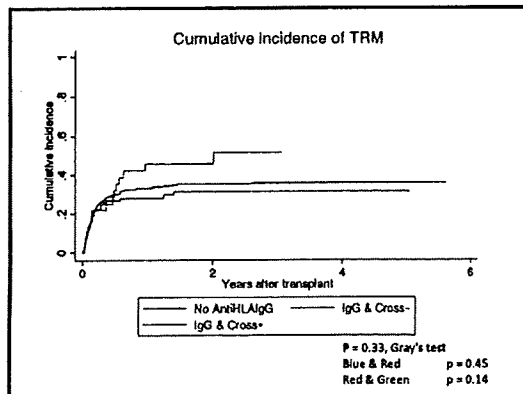
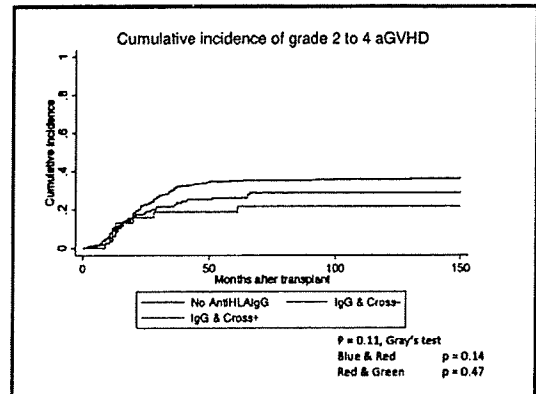
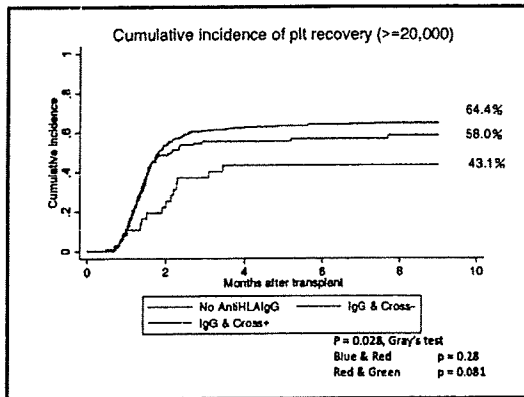
	Anti HLA IgG/L		Anti HLA IgG/Y		P value
	N	%	N	%	
Number of transplants	642				
Paired up at transplant	43 (6-23)				0.007
Median (Range)	43 (6-23)		48 (6-73)		
Patient sex					<0.001
Male	300	(47)	41	(28)	
Female	183	(28)	114	(74)	
Sex matching					0.001
Matched	221	(34)	76	(48)	
Male to Female	127	(20)	58	(37)	
Female to Male	144	(22)	21	(13)	
Disease					<0.001
ALL	130	(20)	27	(17)	
AML	209	(33)	81	(51)	
ATL	24	(4)	7	(4)	
MDS	60	(9)	14	(9)	
CML	14	(2)	11	(7)	
CLL	1	(0)	0	(0)	
MPL	68	(11)	3	(2)	
HL	5	(1)	0	(0)	
MH	4	(1)	1	(1)	
Disease status					0.23
Standard	171	(27)	59	(38)	
Advanced	341	(53)	88	(55)	
Unknown	21	(3)	10	(6)	

患者抗HLA抗体についての解析

	Anti HLA IgG/L		Anti HLA IgG/Y		P value
	N	%	N	%	
Human leucocyte antigen matching (A, B, DR)					
No. of serologically mismatched loci					0.38
Craft-transmit disease direction					
0	52	(11)	24	(18)	
1	198	(40)	81	(38)	
2	240	(49)	78	(43)	
3	1	(0)	0	(0)	
Unknown	1	(0)	0	(0)	
Rejection direction					0.97
0	50	(10)	17	(11)	
1	199	(40)	35	(18)	
2	242	(49)	63	(34)	
3	1	(0)	0	(0)	
Unknown	1	(0)	0	(0)	
ABO matching					0.27
Matched	154	(32)	58	(38)	
Minor mismatch	129	(26)	32	(18)	
Major mismatch	217	(44)	62	(40)	
Unknown	0	(0)	2	(1)	
Number of nucleated cells infused ( $10^6/kg$ )					0.83
Median (Range)	2.68 (0.84-20.8)		2.87 (1.02-21.0)		
Number of CD34+ cells infused					0.94
Median (Range)	0.81 (0.22-4.44)		0.77 (0.18-4.22)		

Cumulative incidence of neutrophil recovery





Anti-HLA IgG & Cross	多変量解析	Hazard Rat.	95%CI	P value	
Neutrophil recovery	No Anti-HLA IgG	1.00			
	IgG & Cross-	0.7822353	0.5847891	0.9935131	0.045
	IgG & Cross+	0.4314947	0.2588604	0.7188813	0.0013
Platelet recovery	No Anti-HLA IgG	1.00			
	IgG & Cross-	0.8381888	0.6112458	1.148418	0.27
	IgG & Cross+	0.5428078	0.3100047	0.8504393	0.033
Grade 2 to 4 acute GVHD	No Anti-HLA IgG	1.00			
	IgG & Cross-	0.7828795	0.5232458	1.175658	0.24
	IgG & Cross+	0.56283	0.2407808	1.318094	0.18
Relapse	No Anti-HLA IgG	1.00			
	IgG & Cross-	1.483048	0.9455457	2.228642	0.085
	IgG & Cross+	1.258211	0.6489551	2.427981	0.5
Transplant-related mortality	No Anti-HLA IgG	1.00			
	IgG & Cross-	0.8821724	0.5754241	1.281815	0.47
	IgG & Cross+	1.236795	0.8928235	2.208438	0.47
Overall mortality	No Anti-HLA IgG	1.00			
	IgG & Cross-	1.000171	0.7284344	1.372277	0.989
	IgG & Cross+	1.187928	0.7347393	1.85852	0.312
Treatment failure	No Anti-HLA IgG	1.00			
	IgG & Cross-	1.082231	0.8090821	1.447595	0.594
	IgG & Cross+	1.182817	0.7582504	1.782008	0.489

Anti-HLA IgG & Cross	その他の因子									
	pt age	pt sex	sex mismatch	ABO mismatch	Diagnosis	Disease status				
	MDS Lymphoma									
Neutrophil recovery	0.035	0.87	0.72	0.47	0.0025	0.88	0.0081			
Platelet recovery	0.29	0.43	0.78	0.49	0.27	0.16	0.0001			
Grade 2 to 4 acute GVHD	0.83	0.78	0.872	0.42	0.14	0.23	0.37			
Relapse	0.32	0.17	0.37	0.8	0.18	0.78	0.00000024			
TRM	0.00035	0.87	0.35	0.64	0.46	0.31	0.0089			
	HLA Hvc cells CD34 cells Flg/men GVHD prophylaxis MTX G-CSF									
	>=2 mismatch Tac vs CyA									
Neutrophil recovery	0.072	0.087	0.000000014	0.21	0.48	0.39	0.00057			
Platelet recovery	0.78	0.58	0.0012	0.82	0.093	0.103	0.38			
Grade 2 to 4 acute GVHD	0.37	0.14	0.062	0.14	0.3	0.12	0.17			
Relapse	0.28	0.12	0.31	0.27	0.536	0.17	0.77			
TRM	0.58	0.42	0.1	0.38	0.0011	0.01	0.88			

Coeficientプラス, relative risk >=1  
 Coeficientマイナス, relative risk <1



# フローサイトメトリーによる造血細胞移植後のキメリズム解析を可能にした アリル特異的抗HLAモノクローナル抗体の特徴

高橋 聡<sup>1</sup>、○渡辺 信和<sup>2</sup>

東京大学医科学研究所 <sup>1</sup>先端医療研究センター、<sup>2</sup>幹細胞治療研究センター病態解析分野

HLA血清学タイピング用に作製されたアリル特異的抗HLAモノクローナル抗体が、フローサイトメトリーでも利用できることがわかり、HLAミスマッチ造血細胞移植後の新規キメリズム解析/HLA-Flow法が開発された。本法は、生着不全や再発の早期診断に役立つことが報告されている。

一方、アリル特異的抗HLAモノクローナル抗体は、その作製が極めて困難であることが知られている。現在、米国 One Lambda 社や英国 AbD Serotec 社から市販されている抗HLA抗体は、すべて合わせても二十数種類ほどで、キメリズム解析/HLA-Flow法に利用するにはその種類は不十分である（本邦の臍帯血移植での適応率は45%以下）。また、これらの抗HLA抗体の多くは、本来リンパ球傷害テスト（LCT）用に開発されたIgM型抗体で、フローサイトメトリーにおける染色性は不良である。したがって、キメリズム解析/HLA-Flow法には優れた特徴があるにもかかわらず、未だ臨床検査法として定着するには至っていない。

そこで我々は、HLAトランスジェニックマウスを異なるHLAのテトラマーで免疫することにより、アリル特異的抗HLAモノクローナル抗体の作製を試み、多くの新規IgG型抗体を作製することに成功した。今回、アリル特異的抗HLAモノクローナル抗体の特殊なエピトープ構造、同抗体の交叉反応性の意義、および我々が開発した抗HLA抗体作製法について概説し、新規に作製された抗体により本検査法の有用性が向上していることについて報告する。

### TRUMPから日本さい帯血バンクネットワークへの移植データ登録方法の確立に向けて (その進捗状況)

長村 登紀子 東大医科研

**ロードマップ**

1. 新規webを用いたTRUMPからJCBBN web経由のアップロードシステムの確立(今年度中予定)
2. JCBBNの過去移植データのTRUMP形式への変換(データベースどうし)を行い、TRUMPを介して一旦移植施設へ送還(今年度中予定)
3. 脐帯血品質管理としてJCBBN移植データの充実化:Validationおよび解析(脐帯血バンクネットワークにて)
4. データ利用しやすいシステム構築(一元化全体で)
5. 国際協働の必要性:項目の再検討(一元化全体で)

### TRUMPからJCBBN web経由のアップロードシステム ロードマップ今後の予定

2008
12月:
1. NIS plus側と 日本さい帯血バンクネットワークホームページのアップロード画面の作成依頼。
2009
1月: ホームページの画面設定→関係者間でテスト運用
2月: 造血細胞移植学会でのアナウンス、できれば模擬をVideo等にて流して説明する。
3月: テスト運用
4月: 実施
5月: 不具合修正

### 今後のJCBBNへの100日登録の流れ

- ① 指定した場所に書き出したファイルが形成されます。
- ② 指定場所にこのような暗号化されたファイルが保存されます。
- ③ 100日報告の書き出したファイルデータを任意の場所から記憶媒体(USBメモリ等)に保存します。
- ④ WEB登録用PCへ持ち運ぶ。
- ⑤ 日本さい帯血バンクネットワークのホームページを開きます。

- ⑥ 移植施設報告の部分をクリックします。ログイン画面がでます。
- ⑦ 移植施設報告のログイン画面に移植施設利用規約とパスワードを入れてログインします。
- ⑧ 脐帯血バンク名および脐帯血IDまたは脐帯血番号を入力し、選択するファイルを選択して、アップロードし、TRUMPのデータを登録します。
- ⑨ アップロードしたデータを一元管理データ登録完了画面の登録データ確認ボタンを押していただく、登録されたデータが見えます(予定)。

脐移植施設のメールアドレスと各バンクに登録終了の報告がメールで転送されます。

### 日本さい帯血バンクネットワーク(JCBBN) 移植データベース状況

初回登録完了数: 4,012units(初回3,039 移植歴973)

1年目: 1,597 units → 現在 JCBBN移植小委員会中心にValidation中

2年目: 803 units (Data at 2008/11/10)

初回移植: 2008/11/10時点で生存1478例、中央観察期間: 191日(0-3,999日)

### 今後の課題

1. web送信の際の不具合が生じたときの問い合わせ先
  - 各脐帯血バンク 事務局
  - FAQを作成して対応
2. web送信不許可の移植施設への対応方法
  - ファイルを各脐帯血バンク事務局へ送付
  - 各脐帯血バンク事務局からJCBBN画面にアップロード(直接サーバに連絡)
3. 脐帯血ID、患者IDの入力間違いへの対応
  - web送信不可能⇒各バンクへ問い合わせ
4. データの修正
  - 各移植施設から 再度入力→web送信
5. 項目の見直し
  - 移植登録一元化管理委員会中心に見直し
6. 過去データのValidationおよび移植施設へのデータ返還
  - 現在Validation中、過去データ問い合わせ→データセットとして一元化事務局介してTRUMPへ

厚生労働省科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業  
「脐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

平成20年度第2回班会議(平成21年1月17日)

各種臨床試験のデータ管理状況の報告

熱田由子

名古屋大学医学部  
造血細胞移植情報管理・生物統計学

加藤班 データ管理担当臨床試験

- 複数脐帯血同時移植の臨床第Ⅱ相試験  
◦ 兵庫医科大学 甲斐俊朗先生
- 成人における骨髄破壊的前処置による非血縁者間脐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)  
◦ 国立がんセンター中央病院 田野崎隆二先生
- 小児急性白血病に対するリン酸フルダラピンを用いた前処置の安全性・有効性に関する検討  
◦ 昭和大学藤が丘病院 磯山恵一先生

C-SHOT

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  
Center for Supporting Hematology-Oncology Trials

トップ 目的 組織 職員 協力機関 Information 問い合わせ お問い合わせ先 問い合わせ先 問い合わせ先

理事長  
石丸信之(名古屋大学大学院医学系研究科分子応答免疫学講座・教授)

副理事長  
夏美直彦(豊田保健衛生大学医学部血液・化学療法 教授)

常任理事  
木下真博(名古屋大学大学院医学系研究科血液・腫瘍学 准教授)  
河野彰夫(筑波大学大学院医学系研究科血液・腫瘍学 准教授)  
鈴木洋彰(名古屋大学大学院医学系研究科血液・腫瘍学 准教授)  
橋本政也(国立行政法人国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター)  
吉見礼美(名古屋大学大学院医学系研究科血液・腫瘍学 准教授)  
湯正史(愛知学院大学大学院医学部血液・腫瘍学 准教授)  
熱田由子(名古屋大学大学院医学系研究科血液・腫瘍学 准教授)

データ管理学の学問・技術体系

試験担当:  
複数脐帯血試験 倉田美穂  
成人脐帯血試験 杉浦歌織  
(天野星子) Rondel et al. Clinical Data Management

臨床試験データ管理  
データセンター業務内容

- 計画
  - プロトコルレビュー・記載の補助(症例数算定)
  - 各種調査票の作成
- 遂行
  - 患者登録・進捗管理
  - 有害事象報告時の対応
  - データの入力・チェック・問合せ・および固定
  - モニタリング
- 解析
  - 論文執筆の補助

進捗管理\_複数脐帯血試験

参加施設・担当医 | 登録事務局 | データセンター

IRB承認結果通知書

症例登録票

CRF等書類の送付

CRF等書類の提出案内・督促

問合せ

## データ収集

参加施設の負担をできる限り軽減するために・・・

- ・ 臍帯血バンク報告書（100日・1年）
- ・ TRUMPを用いた一元化登録
  - 必ず提出しなければならない
- ・ 各試験のCRF
  - バンク報告書に含まれていない調査項目のみを調査項目とした

## 移植登録一元管理プログラム

## データ提出方法

参加施設・担当医

データセンター



郵送

「移植登録一元管理プログラム」からの書き出しデータ  
移植後100日・移植後1年



郵送

各試験の紙CRF

## データ提出方法

参加施設・担当医

データセンター



受領の連絡(電子メール)

提出データに関する問合せ(郵送)



## データ提出方法

参加施設・担当医

データセンター



こちらの提出がわすれられやすい！！

臍帯血試験: 12/36で紙CRFのみの提出

できるかぎり、を用いた電子登録データの提出をお願いいたします！

## プロトコル一式ダウンロード

- ・ C-SHOT HP (<http://www.c-shot.or.jp/>)
- ・ 試験関係者のみ(アクセス制限)
- ・ 医師登録



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  
Center for Supporting Technology-Oncology Trials

