

201028015B

---

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 20～22 年度 総合研究報告書

---

平成 23 年 (2011 年) 3 月

研究代表者 加藤 俊一

## 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・治療研究事業の一つである「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」班における平成20～22年度（2008～10年度）の研究成果を総合研究報告書としてまとめたものである。

本研究班は臍帯血移植の技術の高度化と提供される臍帯血の品質向上を目的として平成17年度に開始された。第1期3年間の研究の継続と発展のために、平成20年度から2期目の研究班を組織し、合計6年間にわたり臍帯血移植と臍帯血バンクに関する総合的な研究を実施した。

わが国における臍帯血移植は1994年の同胞間移植に始まり、その後各地の研究者やボランティアにより地域臍帯血バンクが設立されて、1997年には国内で最初の非血縁者間臍帯血移植が実施された。厚生省（当時、現在厚生労働省）の臍帯血移植検討会での中間まとめに基づき、1999年に日本さい帯血バンクネットワークが設立されてわが国における臍帯血移植と臍帯血バンク事業は本格的に始動することとなった。

厚生労働科学研究はこのような国家的な事業を円滑に推進することを目的に課題設定が行われて交付されているが、本研究班は臍帯血移植と臍帯血バンクに関する総合的な研究を目的に発足したものである。臍帯血の採取に始まり、調製保存、提供、移植実施、移植結果報告、移植成績解析までにいたる各プロセスについて、それぞれの分野における中心的な研究者により研究班を構成し、2期6年にわたり精力的な研究が行われた。研究分担者のみならず全国の臍帯血バンク関係者や移植医の全面的な協力により、国際的にみても高く評価される数々の研究成果をあげることができたことを感謝申し上げたい。

2011年3月

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 造血幹細胞移植、再生医療科学	研究計画立案・総括 臨床研究事務局
研究分担者 (五十音順)	東 英一	三重大学医学部附属病院・准教授 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 小児腫瘍血液学	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・講師 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 血液内科学	臍帯血の骨髄内移植法の基礎的検討
	磯山 恵一	昭和大学藤が丘病院・教授 小児血液学	小児における臍帯血移植至適前処置法の確立
	小川 啓恭	兵庫医科大学・教授 造血幹細胞移植	臍帯血の骨髄内移植に関する研究
	甲斐 俊朗	兵庫医科大学・教授 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 小児血液学	臍帯血移植時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 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 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 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	虎の門病院血液内科・部長 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	国立がん研究センター中央病院・医長 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 血液学	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 産婦人科学	臍帯血採取法の改良
森尾 友宏	東京医科歯科大学医学部・准教授 小児免疫学	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 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	19
熱田 由子	
4. 臍帯血幹細胞骨髄内移植に関する研究	23
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の検討	25
磯山 恵一	
6. 臍帯血の骨髄内移植に関する研究	29
小川 啓恭	
7. 複数臍帯血移植臨床第Ⅱ相試験	35
甲斐 俊朗	
8. 非血縁者間臍帯血移植における真菌感染症および移植データ一元化事業	39
加藤 剛二	
9. 臍帯血バンクの効率性とより適正なコスト計算をするために解決すべき諸課題について	43
河原 和夫	
10. 臍帯血の品質管理と評価	47
高梨 美乃子	
11. 新規キメリズム解析法 (HLA-Flow 法) の問題点の解析とその解決に向けた研究	51
高橋 聡	
12. 高齢者臍帯血移植における GVHD 予防法の確立に関する研究	53
谷口 修一	
13. 成人における臍帯血移植 (骨髄破壊的前処置法の標準化)	59
田野崎 隆二	
14. 臍帯血バンクにおける移植データ管理	69
長村 登紀子	
15. 臍帯血採取方法の改良に関する研究	75
正岡 直樹	
16. ex vivo 増殖臍帯血 T 細胞 輸注療法の臨床研究	79
森尾 友宏	
III. わが国における臍帯血移植の動向	87
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	93
V. 本研究費による研究成果・刊行論文別刷	119

# I. 総括研究報告

研究課題：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

総合研究報告書

研究代表者：所属機関 東海大学医学部

氏名 加藤俊一

研究分担者：東 英一（三重大学医学部）、足立壮一（京都大学医学研究科）、  
熱田由子（名古屋大学医学部）、安藤 潔（東海大学医学部）、  
磯山恵一（昭和大学藤が丘病院）、小川啓恭（兵庫医科大学）、  
甲斐俊朗（兵庫医科大学）、加藤剛二（名古屋第一赤十字病院）、  
河原和夫（東京医科歯科大学医学部）、高梨美乃子（東京都赤十字血液センター）、  
高橋 聡（東京大学医科学研究所）、谷口修一（虎の門病院）、  
田野崎隆二（国立がん研究センター）、長村登紀子（東京大学医科学研究所）、  
正岡直樹（東京女子医科大学）、森尾友宏（東京医科歯科大学医学部）

## 1 研究目的

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。

## 2 研究方法

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。

### (1) 基礎的研究～橋渡し(TR)研究

① 骨髄内臍帯血移植基礎研究（安藤潔研究分担者）

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検討した。

② 麻疹DCワクチン（東英一研究分担者）

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、第一相臨床試験を実施した。

③ 臍帯血T細胞増幅（森尾友宏研究分担者）

「ex vivo増幅臍帯血T細胞輸注療法の臨床研究」について全国の移植医にアンケート調査を行い、研究計画書を作成した。

有効性の評価項目の1つとなる臍帯血移植後の免疫モニタリング項目について、増幅T細胞非投与群（対照群）において検討を行った。

### (2) 臍帯血提供体制の基盤整備

④ 臍帯血採取法改良（正岡直樹研究分担者）

株式会社ニプロの協力をえて、臍帯血採取方法の安定化を目的として採取バッグの改良を試みた。

⑤ 臍帯血品質評価（高梨美乃子研究分担者）

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た。

### (3) 臨床研究の基盤整備

⑥ 臨床研究進捗管理（熱田由子研究分担者）  
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を行った。

⑦ 移植データ管理（加藤剛二・長村登紀子・熱田由子研究分担者、加藤俊一研究代表者）

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を進めた。

### (4) 臨床研究

⑧ 小児臍帯血移植（足立壮一研究分担者）  
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前向き臨床研究を実施し、症例の蓄積を行った。

⑨ 小児AML成績解析（磯山恵一研究分担者）、  
小児急性骨髄性白血病（AML）における臍帯血移植の成績を後方視的に解析した。

⑩ 骨髄内臍帯血移植（小川啓恭研究分担者）、  
臍帯血移植の投与ルートとして骨髄内に輸注する第一相臨床研究を実施した。

⑪ 複数臍帯血移植（甲斐俊朗研究分担者、加藤俊一研究代表者）

I期において開始された複数臍帯血移植の前向き臨床研究が計画どおりに進行し、その結果の解析を行った。

⑫ HLA抗体と移植成績（高梨美乃子研究分担者・加藤俊一研究代表者）

移植時に患者血清中に存在するHLA抗体が移植後の生着や生存に与える影響の有無について後方視的検討を行った。

⑬ 精緻な生着解析（高橋聡研究分担者）

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

メリズムの解析を行った。

- ⑭ 高齢者臍帯血移植（谷口修一研究分担者）  
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を行った。
- ⑮ 成人臍帯血移植（田野崎隆二研究分担者、加藤俊一研究代表者）  
成人における至的移植法確立のための前向き臨床試験が開始され、症例の登録、移植の実施を進めた。

#### (5) 臍帯血バンクの経費と組織に関する研究

- ⑯ 臍帯血バンクの経費と組織（河原和夫研究分担者、加藤俊一研究代表者）  
平成18年の本研究班の集計データ（平成17年度の各バンク実績）によりGMP適用を行った場合のコスト計算を行った。  
また、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を行った。

#### (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。

### 3 研究結果

#### (1) 基礎的～TR研究

- ① 骨髄内臍帯血移植基礎研究（安藤潔）  
移植後のヒト造血幹細胞の動態をクローンレベルで解析できるアッセイ系を確立し、造血再構築過程におけるニッチの役割や酸化ストレスの影響などを明らかにした。
- ② 麻疹DCワクチン（東英一）  
抗麻疹DCワクチンをICを得た造血細胞移植後の10例の患者に投与したところ、副反応は認められず、麻疹抗体を産生する特異的B細胞の増加が確認された。  
これらの結果から、DCワクチンの安全性と有効性の示唆が得られたと考えられる。
- ③ 臍帯血T細胞増幅（森尾友宏）  
移植後に重篤な感染症などの合併のない臍帯血移植後の患者においては、一般的な免疫学的指標（白血球数、リンパ球数、IgG、sIL-2R、PHA反応などは早期に回復することと、抗原特異的T細胞はIFN- $\gamma$ 再生能とともに回復することなどが分かった。

#### (2) 臍帯血提供体制の基盤整備

- ④ 臍帯血採取法改良（正岡直樹）  
採取バッグを改良した試作品により、臍帯血採取量を従来法よりも5～20ml程度増加させることができることが明らかになった。また、試作品の使用経験が増すにつれて採取量も増加したことから、改良バッグの取扱いへの習熟が必要であると考えられた。
- ⑤ 臍帯血品質評価（高梨美乃子）  
同一の凍結検体を11のバンクに配布して臍帯血細胞の量的・質的検査結果について比較したところ、白血球数と生細胞率につ

いては施設間の差は容認される範囲内であった。しかし、死細胞除去gatingをいれた標準法によるCD34+細胞数とコロニー形成数は施設間差が大きかった。

無菌検査の標準化試験結果を基にして日本さい帯血バンクネットワークの新基準を策定した。

#### (3) 臨床研究の基盤整備

- ⑥ 臨床研究進捗管理（熱田由子）  
I期より継続して実施した複数臍帯血移植と成人臍帯血移植の前向き臨床研究についての進捗管理をC-SHOTに委託し、精度の高い臨床研究を実現することができた。
- ⑦ 移植データ管理（加藤剛二・長村登紀子・熱田由子・加藤俊一）  
I期からII期にわたって日本における造血細胞移植のデータ一元化を実現すると同時に、日本さい帯血バンクネットワークに蓄積された移植データベースを一元化データベースに変換する作業を完成した。

#### (4) 臨床研究

- ⑧ 小児臍帯血移植（足立壮一）  
小児の臍帯血移植後のGVHD予防法としてのシクロスポリンの至的投与法を確立するために、シクロスポリン投与後3時間の血中濃度を指標として投与量を調節することにより安定した効果と副作用の軽減が可能であることが示唆された。
- ⑨ 小児AML移植成績（磯山恵一）  
わが国で臍帯血移植を実施した小児AMLにおける移植成績と長期予後について解析したところ、移植後の生着に対しては移植CD34陽性細胞数が有意に影響を与える因子となり、移植後の生存率に有意に影響を与えたのは移植時の病期のみであり、HLA適合度や移植細胞数は有意の相関を示さなかった。
- ⑩ 骨髄内臍帯血移植（小川啓恭）  
第一相試験を完了して、プライマリーエンドポイントとした安全性には問題を認めなかった。とくに洗浄をしない臍帯血を直接骨髄内に投与しても特別な副反応を認めなかった。
- ⑪ 複数臍帯血移植（甲斐俊朗・加藤俊一）  
平成22年2月に目標の70例の登録を終え、61例において移植が実施された。プライマリーエンドポイントである1年無イベント生存(EFS)の観察期間が完了した。  
研究期間中に2度有害事象のモニタリング検討会を行ったが、有害事象として報告された事象はいずれも造血細胞移植後に一般的に見られるものであり、複数臍帯血移植に起因するものとは考えられなかった。  
主要評価項目である1年EFSは48%で、リスク別にみたEFSも従来の非血縁者間臍帯血移植の成績と同等と評価され、複数臍帯血移植の有用性が示された。
- ⑫ HLA抗体と移植（高梨美乃子・加藤俊一）  
移植時に患者の血液中にHLA抗体が存在し、その抗体が移植される臍帯血の不適合

HLA抗原に反応する場合には、生着率と生存率のいずれにも悪影響を与えるが、HLA抗体が存在していても臍帯血の不適合抗原と反応しない場合には影響がないことが明らかにされた。

また、このHLA抗体による生着や生存に対する悪影響は移植される臍帯血中のCD34陽性細胞が少ない場合により強く認められることが判明した。

これらの結果は国際誌BLOODに論文として掲載された。

#### ⑬ 精緻な生着評価（高橋聡）

ドナーと患者において異なるHLA抗原に対する抗体と細胞リニエージ毎に特異的な抗体による二重染色により、移植後の細胞リニエージ毎のキメリズムを定量的に解析することができた。とくに移植後に白血病の再発が疑われる症例において、患者由来の白血病細胞を早期に同定できることが分かった。

#### ⑭ 高齢者の臍帯血移植（谷口修一）

虎の門病院で移植が実施された55歳以上の高齢患者において、臍帯血ミニ移植と血縁者間骨髄・末梢血幹細胞移植を比較したところ、生着率においては血縁者移植が優れていたが、3年生存率においては両群に差を認めなかった。

#### ⑮ 成人臍帯血移植（田野崎隆二・加藤俊一）

18施設において倫理委員会の承認が得られ、目標症例28例のうち13例の登録が行われた。HLA抗体を持たない症例において移植が実施された。

#### （5）臍帯血の医薬品化に関する研究

#### ⑯ 臍帯血バンクの経費と組織（河原和夫・加藤俊一）

平成17年度の各バンクの実績を基に試算したGMP基準適用時のコストはバンクのサイズにより大きく異なり、出庫1件あたりの費用は274万円から1,239万円までに分布し、平均498万円であった。

平成20年度の11臍帯血バンクの公開データを基にしてプロセスと品質の2点について比較を行ったところ、有核細胞数が多い臍帯血を多数採取しているにもかかわらず作業効率が悪いバンク、作業効率は良いものの有核細胞数の多い臍帯血をより多く確保する必要があるなど品質面での改善を行わなければならないバンクなどが明らかとなった。

## 4 考察

わが国における非血縁者間臍帯血移植の実施は増加の一途をたどり、最近では非血縁者間骨髄移植とほぼ同数となって推移している。また、国際的にみても全世界で実施されている非血縁者間臍帯血移植の3分の1近くをわが国が占めている。

本研究班における研究はこのような動向を背景にして精力的に進められ、また研究成果は研究会議や学会での発表や論文化などを通じて

臨床の現場に反映されて、移植数の増加に結びついているものと考えている。

一方で、臍帯血の採取、保存、提供という重要な役割を担っている11の臍帯血バンクはいずれも累積の赤字のために運営の危機に直面し、一部の臍帯血バンクは存続が危ぶまれている。

本研究においては、そのような臍帯血バンクの経費や組織のあり方について詳細な検討を行ったが、厚生労働省の補助金に依存する財政構造には限界があり、臍帯血移植が初期の実験的医療の段階から日常的な医療として定着した現在、保険診療の中で正しく位置づけていくことが望まれる。

また、より安全で質の高い臍帯血を収集し、医療の現場に安定的に提供していくためには、行政の関与による基準作りが不可欠ではないかと考える。

## 5 評価

本研究班は臍帯血バンクと臍帯血移植に関して、臍帯血の採取から移植実施とその報告体制にいたるまでの諸問題を網羅的かつ包括的に検討する計画が立案され、2期6年間にわたって全国の臍帯血バンクと移植施設の参加をえて研究分担者の相互の協力により研究が実施されたものである。

### 1) 達成度

- ・基礎的研究と橋渡し研究については探索的な内容であることから、十分な達成度であったと考えている。

- ・臍帯血の採取法についてはI期目のカンガルーケア法による採取量増加という成果に続いて、採取バッグの改良によりさらに採取量を増加させられる可能性が示された点で研究目的は十分に達成されたと考えている。今後、成果の論文化と企業による商品化を急ぐ必要がある。

- ・臍帯血バンクにおける臍帯血の品質評価法に関する研究については一定の成果はみられたものの、今後日本さい帯血バンクネットワークの技術部会や事業評価委員会などにおいて検討の継続が必要と考えられる。

- ・臨床研究の基盤整備に関する研究では、造血細胞移植のデータ一元化を日本造血細胞移植学会と協力して完成させた点で、本研究班は十分にその役割を果たしたと考えている。

- ・前向き臨床研究のうち複数臍帯血移植と骨髄内臍帯血移植については研究期間中に目標症例を達成できたが、成人臍帯血移植の多施設共同前向き研究は目標の症例数の半数程度にとどまった。複数臍帯血移植については本研究班を通じてしか移植が可能でないことが目標達成を可能にしたのに対して、成人臍帯血移植については参加施設における倫理審査に予想以上の時間を要したことが影響して研究期間中に完成させることができなかった。しかしながら、症例の登録は現在も行われていることから、今後もこの研究は継続されるべきものと考えている。

- ・後方視的研究では、I期目に続いてII期目に



においても数多くの研究成果をあげることができた。とくにHLA抗体が移植結果に及ぼす影響を明らかにできたのは、臍帯血バンクにおいて患者検体の保存が規定どおりに行われていたことと、臍帯血移植に関するデータの収集体制が整備されていたことが背景にある。また、抗体の測定に際して日本赤十字社の全面的な協力があつたことが国際的にも高く評価される研究結果に結びついたものと考えている。

・臍帯血の医薬品化に関する研究についてはI期目に続いて各バンクの実績を基にして詳細な検討を行ったが、本研究班のみで完結できない点も多く、今後は日本さい帯血バンクネットワークの将来構想委員会などの場において継続して検討を行う必要がある。

## 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

・1期目に精力的に行った疾患別あるいは疾患横断的な後方視的移植成績研究は国際的な医学誌に発表され、国内の研究者に有用な情報を提供したとともに、国際的にも高く評価されている。

・HLA抗体が移植結果に与える影響を世界で初めて明らかにしたことは、学術的にも国際的にも社会的にも高く評価されるものと考えている。

この研究成果を基にして、国内では臍帯血の選択に際してHLA抗体の測定をすることが必須と考えられるようになり、その結果に基づいて臍帯血を選択できるようになったことから、臍帯血移植の最大の問題点であった生着不全を減少させることができるようになった。

## 6 結論

臍帯血バンクと非血縁者間臍帯血移植に関する総合的な研究を実施し、臍帯血採取法の改良、臍帯血の品質評価法の改善、HLA抗体検査による臍帯血の選択、後方視的な移植成績の解析と論文化、質の高い前向き臨床研究の実施などの成果をあげることができた。

## 7 研究発表

### 1) 論文

2008～2010年に刊行された英文論文で、本研究費の補助によることが明記されている論文数は以下のとおりである。

研究代表者（研究分担者との共著も含む）

加藤俊一 11本

研究分担者（研究代表者との共著も含む）

熱田由子 3本

安藤 潔 1本

磯山恵一 2本

甲斐俊朗 7本

加藤剛二 7本

高梨美乃子 4本

高橋 聡 4本

谷口修一 4本

長村登紀子 6本

### 代表的な論文

1. Yahata T, Muguruma Y, Yumino S, Sheng Y, Uno T, Matsuzawa H, Ito M, **Kato S**, Hotta T, Ando K. Quiescent human hematopoietic stem cells in the bone marrow niches organize the hierarchical structure of hematopoiesis. **Stem Cells**. 2008 Dec;26(12):3228-36.
2. Narimatsu H, Miyakoshi S, Yamaguchi T, Kami M, Matsumura T, Yuji K, Murashige N, Kusumi E, Kodama Y, Komatsu T, Sakamaki H, Kouzai Y, Okada M, Osugi Y, Kobayashi R, Inoue M, Takahashi S, Kai S, Kato K, Inoue-Nagamura T, Taniguchi S, **Kato S**; Japan Cord Blood Bank Network. Chronic graft-versus-host disease following umbilical cord blood transplantation: retrospective survey involving 1072 patients in Japan. **Blood**. 2008 Sep 15;112(6):2579-82.
3. Nagamura-Inoue T, Kai S, Azuma H, Takanashi M, Isoyama K, Kato K, Takahashi S, Taniguchi S, Miyamura K, Aoki K, Hidaka M, Nagamura F, Tojo A, Fang X, **Kato S**; Japan Cord Blood Bank Network. Unrelated cord blood transplantation in CML: Japan Cord Blood Bank Network analysis. **Bone Marrow Transplant**. 2008 Aug;42(4):241-51.
4. Yoshimi A, Kojima S, Taniguchi S, Hara J, Matsui T, Takahashi Y, Azuma H, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kai S, **Kato S**; Japan Cord Blood Bank Network. Unrelated cord blood transplantation for severe aplastic anemia. **Biol Blood Marrow Transplant**. 2008 Sep;14(9):1057-63.
5. 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, Koderia 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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**. 2010 Jan;45(1):69-77.

9. Takanashi M, Atsuta Y, Fujiwara K, Kodo H, Kai S, Sato H, Kohsaki M, Azuma H, Tanaka H, Oga wa A, Nakajima K, **Kato S**. The impact of anti-H LA antibodies on unrelated cord blood transplantations. **Blood**. 2010 Oct 14;116(15):2839-46.
  10. Morio T, Atsuta Y, Tomizawa D, Nagamura-Inoue T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara T, Kato S. Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88 patients with primary immunodeficiency in Japan. *Brit J Haematol*, 2011 (in press).
  11. 杉本達哉、佐藤 薫、佐々木ひとみ、中塩屋千絵、兵藤 理、土田文子、櫻井朋美、村上美知、山口陽子、板垣浩行、武井美恵子、菅井さや佳、三島大志、小林信昌、吉場史朗、加藤俊一。凍結臍帯血の保存バッグとセグメント間の造血機能検査（有核細胞数、生細胞率、CD34測定、CFU-GM測定）の比較と凍結期間による造血機能の評価。日本輸血細胞治療学会誌、2009;55(6):683-690.
- 2) 国際学会招待講演（研究代表者分記載）
1. **Kato S**. Cord blood transplantation in Japan. BMT Tandem Meeting, Feb.13-17, 2008, San Diego, USA.
  2. **Kato S**. Cord blood banking and cord blood transplantation. ISBT XXXth International Congress, June 7-12, 2008, Macao, China.
  3. **Kato S**. Report from Japan and Asia. 20<sup>th</sup> Anniversary of the First Cord Blood Transplant and the 10<sup>th</sup> Anniversary of Netcord Bank Organization. Oct. 16-19, 2008, Canne, France.
  4. **Kato S**. Cord blood banking and cord blood transplantation in children in Japan. 22<sup>nd</sup> International Congress of Pediatrics. Oct.14-18, 2010, Tehran, Iran.
- 8 知的所有権の出願・取得状況
- 1 特許取得
    - 1 件
      - 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  
総合研究報告書

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 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相臨床試験を実施し、終了した。現在論文投稿中である。

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・准教授

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。なお、本臨床試験はヘルシンキ宣言に基づいて計画されており、また、三重大学医学部附属病院倫理委員会の承認を得ている。対象となる患者には文書を用いて説明し、同意を得た。

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：胸腺機能回復の指標として 1) flow cytometry 法にて末梢血 true naive T cell (CD4+CD45RA+CD62L+CD11a-) 数を、2) 定量的 PCR 法にて末梢血 T-cell receptor excision circle (TREC) コピー数を、また、3) T-cell receptor  $\beta$  (TCR $\beta$ ) complementarity- determining regions 3 (CDR3) の spectratyping を検討する。

### C. 研究結果

コホート1：3例、コホート2：3例、コホート3：4例の HCT 患者に MV-DC ワクチンを接種した (表1)。10例すべてにおいて DC

表 1. Characteristics of HCT patients

Pt	Age at cohort	Diagnosis	LAMV before HCT*	Duration from HCT	HC source	Chronic GVHD	Immuno-suppressant
1	18 yr / M	Infant ALL	+	15 mo	uBM	-	-
2	2 yr / M	T-ALL	+	27 mo	dCB	-	-
3	4 yr / M	NB	-	24 mo	aBM	-	-
4	8 yr / M	AA	+	12 mo	uBM	-	Tacrolimus
5	7 yr / M	Ph+ ALL	+	14 mo	uBM	-	-
6	2 yr / M	AML	+	15 mo	uCB	-	Tacrolimus
7	25 yr / F	AML	+	10 yr	rBM	+	Tacrolimus
8	2 yr / F	Infant ALL	-	6 mo	uBM	-	-
9	13 yr / M	AA	+	10 mo	rBM	-	-
10	13 yr / F	APL	+	6 mo	uBM	-	-

ワクチン接種後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であった。

血清 MV 抗体価は ELISA 法で 8/10 例に、HI 法にて 2/10 例に抗体価の陽転を認めた (表 2)。また、9/10 例で麻疹特異的 B 細胞の増加を認めた (図 1)。

我々が検討した HCT 後 2 年以上経過した症例の末梢血 true naive CD4+ T cell 数の中央値は 250/mm<sup>3</sup> であった。一方本臨床試験の患者においては 6/10 例において true naive CD4+ T cell 数が 250/mm<sup>3</sup> 未満であった (表 3、図 2)。TREC のコピー数は年齢とともに減少していくことが報告されているが、正常値の設定については今後の検討が必要である。しかし、本臨床試験では、症例 8 のように末梢血中に TREC が検出されない症例も含まれ

ていた (表 3)。TCR-V $\beta$  の spectratyping においては、ピーク数が 8 未満の subfamily が未回復であるとの報告が多い。症例 1、2、4、8 のように多数の subfamily においてピーク数が少ない症例があった (表 3、図 2)。

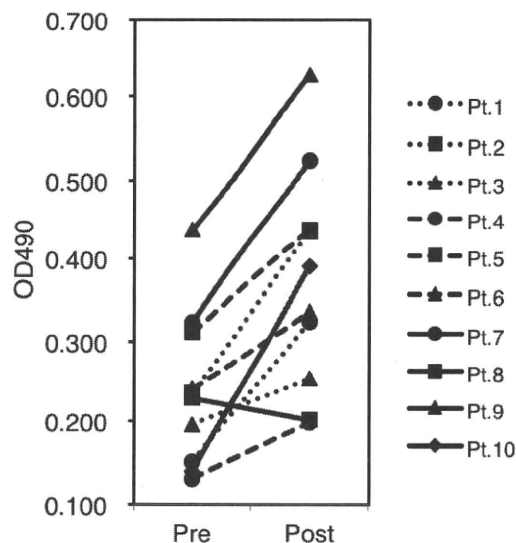


図 1 MV-specific memory B cell

表 2 Serum anti-Measles antibody titer

Pt	Cohort	HI		ELISA		
		Pre	6 wk	Pre	6 wk	4-12 mo
1	1	<8	<8	<2.0	3.2	3.9
2	1	<8	<8	<2.0	2	<2.0
3	1	<8	<8	<2.0	<2.0	<2.0
4	2	<8	<8	<2.0	3.1	3.0
5	2	<8	<8	<2.0	2.4	ND
6	2	<8	<8	<2.0	5.7	0.4
7	3	<8	<8	<2.0	5.1	ND
8	3	<8	<8	<2.0	<2.0	ND
9	3	<8	8	3.8	7.5	ND
10	3	<8	8	3.3	8.3	ND

#### D. 考察

接種する DC ワクチン量が多いほど麻疹抗体価の上昇が大きい傾向にあった。特にコホート 3 の 2/4 例では麻疹自然感染を予防するとされている HI 抗体価 8 倍まで上昇した。一方で少量（コホート 1）でも 2/3 例に抗体価の上昇を認めており、1 回接種量が少なくても頻回接種によるブースト効果により麻疹免疫を獲得しうる事が示唆された。

胸腺機能と DC ワクチンの有効性については、症例 8 のように今回検討した 3 種類の免疫学的マーカーすべてにおいて胸腺機能が未回復であると判断される症例は、ワクチン接種量が多くても、効果が得られないことが示唆された。またコホート 3 の症例 7、9、10 については、胸腺機能が回復していると判断されるが、症例 7 のみ血清麻疹 HI 抗体価の陽転

を認めなかった。症例 9、10 はワクチン接種前の ELISA 価が陽性であり、原疾患罹患以前に接種した通常の麻疹生ワクチンの効果が残存しており、麻疹 DC ワクチンによりブースト効果が得られた可能性がある。また、症例 7 は DC ワクチン接種時に慢性 GVHD に対してタクロリムスを服用していた。免疫抑制剤が本

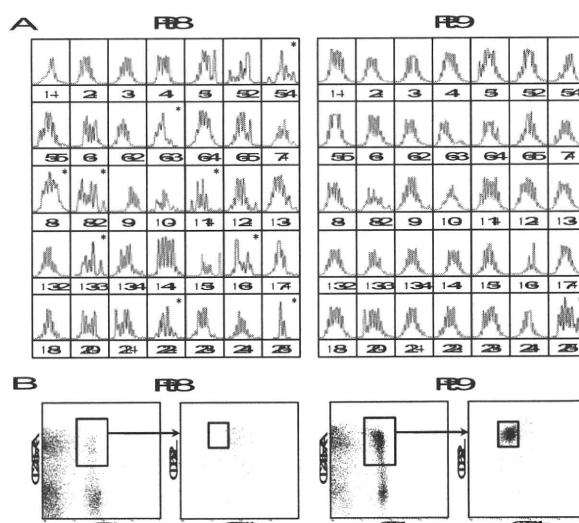


図 2 Thymic recovery A: TCR-Vβ spectratyping, B: True naive CD4+ T cell

表 3 Thymic recovery

Pt	Cohort	TCR-Vβ subfamilies	TREC	TNCD4
		with <8 peaks (/ 35 subfamilies)	(copies / μg DNA)	(cells / mm <sup>3</sup> )
1	1	18	811	1106
2	1	6	1515	139
3	1	0	7181	328
4	2	9	19420	190
5	2	1	9445	31
6	2	1	14404	69
7	3	1	7239	340
8	3	9	0	7
9	3	1	9523	369
10	3	2	1342	43

ワクチンの効果に影響を及ぼした可能性は否定できないが、ELISA 価の上昇は認めており、このような患者に対しても頻回接種により麻疹免疫を獲得可能であることが示唆された。

特になし

#### E. 結論

MV-DC ワクチンが安全かつ有効であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

1) Kumamoto T, Azuma E, Hirayama M et al.

A Phase I Clinical Study of Dendritic Cell

Vaccine against Measles for Patients Following

Hematopoietic Cell Transplantation (submitted,

2011)

2) Araki M, Hirayama M, Azuma E, Kumamoto

T, et al. Prediction of reactivity to noninherited

maternal antigen in MHC-mismatched, minor

histocompatibility antigen-matched stem cell

transplantation in a mouse model. *J Immunol*

2010;185:7739-45.

3) Hirayama M, Azuma E Major and minor

histocompatibility antigens to NIMA□:

Prediction of a tolerogenic NIMA effect.

*Chimerism* 2011 (in press)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況



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

造血幹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、ネオーラル® (シクロスポリン内服薬) が導入されてからは、ネオーラル®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し、安全性と有効性を検討する多施設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 (C3 値, C2 値, C0 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:

同上

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7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
- 東海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2年6ヶ月が経過し, 2011年3月末時点で7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.

①C3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. ②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. ③内服変更後も3時間点滴法と同様の動態を示した. ④CsA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

- 1) Hiroshi Matsubara, Souichi Adachi, Itaru Kato, Tatsuya Morishima, Satoshi Saida, Aki Shinzato, Katsutsugu Umeda, Ken-Ichiro Watanabe, Tatsutoshi Nakahata. Three hour drip infusion of cyclosporine A and C3 monitoring in pediatric cord blood transplantation. 6<sup>th</sup> Meeting of the EBMT Pediatric Diseases Working Party. Poznań Poland. 2008.6.2

(Bone Marrow Transplantation 42  
Issue S2, S121, 2008)

- 2) 松原央、足立壮一、加藤裕、才田聡、森嶋達也、新里亜紀、梅田雄嗣、渡邊健一郎、中畑龍俊、シクロスポリン 3 時間点滴静注法と C3 モニタリングについて—小児臍帯血移植 10 例の検討— 第 70 回日本血液学会総会、京都 2008.10.11
- 3) 納富誠司郎、平松英文、河田沙耶架、田中篤志、才田聡、森嶋達也、藤野寿典、松原央、渡邊健一郎、平家俊男、足立壮一 当科におけるシクロスポリン持続投与方法と 3 時間静注 1 日 2 回法の比較検討 第 33 回日本造血細胞移植学会総会 愛媛 2011.3.8

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  
総合研究報告書

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・生物統計学講師

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。

本研究班において計画された以下の3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