

液学会、日本さい帯血バンクネットワーク（以下ネットワーク）のそれぞれに集積されていたが日本造血細胞移植学会データセンターによって作成された TRUMP と呼ばれる共通のプログラムに入力されることですべての移植データ一元化が完成する。非血縁者間臍帯血移植データに関しても 2010 年 7 月 1 日にその稼動が可能となった。

B. 研究方法（倫理面の配慮）

ネットワークにおける移植データ一元化の過程と今後の課題につき検討した。なおネットワークへの移植データ登録に際しては各移植医療機関から日本造血細胞移植学会データセンターに送付される段階で匿名化されており、倫理面での配慮がなされていると考えられている。

C. 研究結果

1. 臍帯血移植データの一元化

臍帯血移植データを日本造血細胞移植学会経由でネットワークへ送付することへの転換：日本造血細胞移植学会内に造血細胞移植登録一元管理委員会が設置され、当初臍帯血移植データはネットワークに構築された web システムに入力されたデータを日本造血細胞移植学会データセンターに送付すべく検討中であったが 2009 年 1 月の本班会議にて得られた移植医からの要望を受け、日本造血細胞移植学会のデータセンター経由で移植データをネットワークが受理する方式への転換につきネットワーク内部で検討して了承された。またこの学会経由でデータを送付することはネットワーク内での倫理委員会にて承認された。

2. 一元化への実務作業：ネットワーク移植データ管理委員会およびバンク連絡調整委員会と日本造血細胞移植学会データセンターと

の協力にて実務作業が実施された。まず臍帯血申込時に症例番号の自動付与が行われる。そして移植後 100 日を経過した時点で移植施設にて TRUMP のプログラムに移植データを入力し、学会データセンターへ web 送信もしくは CD-R を郵送。その後毎月 1 回の頻度で学会データセンターに集約された移植データをネットワーク事務局に郵送。その後ネットワーク事務局では臍帯血番号と臍帯血バンク名の 2 つの項目（key 項目）を自動的に判別することで臍帯血移植データの帰属を確認する。その後帰属の明らかな臍帯血移植データはネットワークの web システムに公開され、各臍帯血バンクでの閲覧が可能になる。なお帰属の不明な臍帯血移植データは全臍帯血バンク閲覧にて帰属を決定する。各臍帯血バンクは自バンクのデータをダウンロードしてデータの確認や解析を行う。その後この手順に沿ってシミュレーションを実施し、種々の問題点を解決して、2010 年 7 月 1 日稼動となった。稼動後は大きな問題なく推移しているが細部の調整は必要であり、今後改善の必要がある。なおこの一元化を機に各移植施設のコードの整理を行った。すなわち移植施設のコードは従来日本造血細胞移植学会が使用しているコードに揃えて、内科と小児科合同で登録病院として申請されている場合は内科、小児科別々に学会コードで運用することとし、今後は新規の合同診療科は認めないこととした。

D. 考察

今年度稼動を開始した臍帯血移植データ一元化システム上の特徴を要約する。1) 症例番号自動付与：全国の移植施設から患者登録がなされた時点で個々の患者に対して症例番号が自動的に付与される。2) 移植データの

集約：移植データはこれまでのように各臍帯血バンクへ送付するのではなくすべて日本造血細胞移植学会データセンターへの送付に一本化される。3) データの送付は web でも可能になった。4) データ督促方法の統一：100日報告の督促はすべての症例に対して2ヶ月毎に自動的になされる。なお移植データに修正を要する場合はデータベースの二重化を防ぐために発生源、すなわち移植施設に修正を依頼して学会データセンターへ送付されることでデータ修正がなされる。5) 移植医の負担軽減：移植医にとって過重となるデータ送付の手間が軽減され、かつ移植病院での移植細胞源の異なる移植成績のデータベース構築が容易になる。

E. 結論

造血細胞移植登録一元化事業に日本さい帯血バンクネットワークが参画することで臨床現場での移植医にとって有用な造血細胞移植データベースの構築が効率的になされ、今後の移植データの解析および治療成績向上に大きく貢献することが期待される。

F. 健康危険情報：本研究における健康危険情報は無い。

G. 研究発表：

1.論文発表：

1) 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 14:1057-63.

2) Nagamura-Inoue T, Kai S, Azuma H, Takahashi 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 42:241-51

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, Takahashi 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, 15:439-46.

2.学会発表：

加藤剛二、吉見礼美、伊藤悦朗ら、小児 ALL に対する非血縁者間臍帯血移植成績、第 30 回日本造血細胞移植学会 2008 年 2 月

H. 知的財産権の出願・登録状況：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

研究分担者 河原 和夫 東京医科歯科大学大学院 医療政策学講座 政策科学分野 教授
研究協力者 井出 健二郎 和光大学経営経済学部 教授
研究協力者 菅河 真紀子 東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 講師

研究要旨

臍帯血の医薬品化のためには、品質管理面から GMP（医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準に関する厚生労働省令、以下 GMP とする）の遵守が求められるが、各バンクは地域性や組織の特性から採取数や出庫数に開きがある。昨年度の研究においては、臍帯血が医薬品化され GMP が適用された場合のバンク全体のコスト計算を行い全体の傾向を把握した。

また、11 臍帯血バンクの公開データをもとに、さい帯血の公開に至るプロセスの事業効率の評価ならびに DEA(Data Envelope Analysis ; 包絡分析法)を用い各バンクの業務効率性を測定した。

その結果、細胞数が多い臍帯血を多く採取しているものの、作業プロセスの効率性が悪いバンク、事業費と労働時間を多く投入しているにも関わらず効率が悪いバンク、逆に少ない投入量で成果を上げている効率が良いバンクがあることが分かった。しかもそれらのバンクを特定することができた。

A. 目的

臍帯血及び臍帯血バンクについては、医薬品でないことから医薬品製造所に対する GMP 査察や GMP に基づく医薬品の製造工程が担保されていない。しかし、一方で医薬品に準じた安全性の確保や品質が求められていることから、医薬品化が図られ GMP が適用された場合の費用を算出することが目的である。

また、全国の 11 か所の臍帯血バンクについて、臍帯血公開に至るプロセスベンチマーキングを行い、わが国における臍帯血バンク事業の質の向上に資する資料を作成した。加えて DEA(Data Envelope Analysis ; 包絡分析法)により事業の効率性を評価し、各バンクの事業効率の順位表を作成することにより、バンク事業の将来像を考える資料とすることも目的である。

B. 方法

本分担研究では、「さい帯血バンクネットワークの公開データ」「臍帯血バンク及び日本臍帯血バンクネットワークの事業・運営評価に関する分析調査（東京医科歯科大学大学院：河原和夫）平成 14、15 年実施」と「臍帯血の医薬品化に関する調査研究報告書（株式会社 野村総合研究所平成 18 年）」のデータ、平成 17 年度の各臍帯血バンクの実績値、日本赤十字社や血漿分画製剤メーカーの協力のもとに上記の目的に沿った分析

を進めた。

C. 結果

GMP 化した場合のバンク全体の 1 件当たりの出庫費用は 4,981,061 円であり、現在の GMP 非適用の場合が 851,540 円であった。出庫 1 件当たりの費用は GMP 化した場合、現在より約 5.8 倍に跳ね上がることになった。

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 点について比較を行い、ベストプラクティスとパフォーマンスの推定を行ったところ、細胞数が多い臍帯血を多く採取しているものの、作業プロセスの効率性が悪いバンク、あるいは作業プロセスの効率性は良いものの細胞数が多い臍帯血を確保する必要があるなど品質面の改善を行わなければならないバンクなど、それぞれのバンクの位置づけと改善点が明らかとなった。

DEA(Data Envelope Analysis ; 包絡分析法)を用い各バンクの業務効率性分析の結果は、細胞数が多い臍帯血を多く採取しているものの、作業プロセスの効率性が悪いバンク、事業費と労働時間を多く投入しているにも関わらず効率が悪いバンク、逆に少ない投入量で成果を上げている効率が良いバンクがあることが分かった。しかもそれらのバンクを特定することができた。

D. 考察

各バンク間の採取 1 件当たりの費用と出庫 1 件当たりの費用については、格差が存在することが明らかとなった。また、バンク全体を見ても GMP 化した場合は、出庫 1 件当たりの費用が現在の、約 5.8 倍に跳ね上がることから、効率的なバンクの運営体制の確立が必要となる。

とりわけ、採取および出庫件数が多い施設では、これらに要する単位当たりの経費が低く抑えられていることが明らかになった。理由としては、規模の拡大（スケールメリット）により各プロセスの費用が低くなったことが考えられる。しかし、この規模の拡大による経済効果は次第に Plateau となり、費用の逓減効果が減弱していく。しかも計算項目の採取、運搬、分離・調整・保存費、設備・機器に関するものは、採取および出庫数に直接影響を受ける因子である。一方、人件費、事務局運営費・役務費については各バンクで必要数などを固定しており採取および出庫数の影響は受けていない。したがって実際は、採取や出庫数がある一定基準を超えて多くなれば、必要人員や事務費などの見直しは不可避であり、これらの数値も変化させる必要がある。前述の近似式では、人件費、事務局運営費・役務費は固定した数値であり、採取数や出庫数の影響を受けていない。よって、これらの点も考慮すれば、スケールメリットを生かしても GMP 化した場合の採取 1 件当たりの費用は、約 10 万円程度で固定してしまうものと考えられる。出庫 1 件当たりの費用についても、200 万円当たりで落ち着くものと考えられる。

プロセスと質の面からの分析と DEA の両者を考慮すると、業務効率等が悪いバンクが特定されたが、これらは新聞報道等でも存続が危ういバンクも含まれていた。事業に影響する事業費や労働時間等の投入量を考えるか、より多くの医療機関からの依頼、移植件数の増加等の出力量を見直すか、あるいはその両者を見直すかの判断が問われる研究結果であった。

E. まとめ

医薬品化を考えるに当たっての経済的な目安を提示できた。経済的には現在よりコストが跳ね上がる。バンクの統廃合も視野に入れたシステムの効率化が必要であるが、コストの逓減には限界がある。また、GMP を適用することによる医薬品化を考えるに当たっては、事業効率や経済的要因も視野に入れながら、臍帯血バンク事業の最適解を求めなければならない。

現実には、11バンクの統廃合や業務範囲の縮小などを視野に入れた再編の時期が来ている。

最近、日本赤十字社は、さい帯血バンク事業を血液事業の関連事業として位置づけた。そして日赤系 5 バンクの会計基準や技術基準の統一の検

討を始めたところである。5 バンクの設立や立地の事情は異なっているが、必要に応じて検査・調整機能・出庫体制の統合や集約化も視野に入れた議論が行われている。

この日本赤十字社の動きは、さい帯血バンクネットワーク自体にも影響を及ぼすものと予想される。今回の研究結果に示されたように、業務改善が極めてむずかしいバンクも存在することから、わが国全体で採取、検査、調整、保存、公開、出庫に至る過程のどの機能を各バンクに持たせていくべきか、考えるときに来ている。

このバンクの全国体制の再構築が完了することにより、さい帯血医療に対する診療報酬や薬価の実情に合った適用を考えていくべきである。その際、会計基準等を統一した日本赤十字社関連のさい帯血バンクの業務内容や建物等の構造設備や保有すべき機器から算定された“さい帯血の原価”は有力な保険価格設定の根拠となるであろう。

今回の研究では投入量である事業費を嵩上げすることは考えなかったが、事業費を増額すればそれぞれの出力変数が増加することも考えられる。つまり、さい帯血バンク事業に対する補助金の増額や診療報酬のアップがそれに相当する。特に移植手技としても骨髄移植に比肩できる成績を上げるに至ったさい帯血バンク事業であるが、骨髄移植のときに骨髄バンクの収入になる 1 件当たり 50 数万円という金額が、さい帯血バンクには 17 万 4 千円しかない。さい帯血技術を適正に評価し、保険診療体系の中での的確に組み込むことによりさい帯血バンクの安定的な財政基盤が確保されると言えよう。

また、GMP を適用した場合のさい帯血のコストについては以下に述べるが、さい帯血の安全性確保の観点からも何らかの製造あるいは調整基準が必要と考える。私の今までの研究でも示してきたように、さい帯血の価格は 1 個約 200 万円と算定してバンクに対する公的な支援が必要である。

参考文献

- 1 株式会社 野村総合研究所 臍帯血の医薬品化に関する調査研究報告書 平成 18 年。
- 2 KPMG ビジネスアシュアランス株式会社。日本臍帯血バンクネットワーク 会計数値及びプロセスの評価に関する報告書。2002 年 5 月 17 日。
- 3 厚生労働科学研究費補助金 中畑班研究 臍帯血医薬品化に関する調査研究 第 2 回アドバイザリー会議 資料 1 海外調査結果。
- 4 河原和夫、他。さい帯血事業の評価とさい帯

- 血療法の経済分析に関する報告. 2003年
- 5 河原和夫、他. さい帯血の移植件数の推計と供給コスト算定に関する参考資料. 2004年
 - 6 河原和夫、他. GMPを適用した場合の臍帯血の製剤化に要する費用の研究 平成19年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業研究事業)
分担研究報告書.

F. 健康危険情報
特になし

- G. 研究発表
1. 論文発表
予定あり
 2. 学会発表
予定あり

- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし
 3. その他
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
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 臍帯血の品質管理と評価

研究分担者 高梨 美乃子 東京都赤十字血液センター製剤部長

研究要旨：

本邦には 11 の臍帯血バンクがあり、14 カ所の調製保存施設にて活動している。臍帯血の品質標準化を目指し、検査手技の標準化を目標とした。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、死細胞除去 gating を入れた標準法による CD34+細胞数について施設間差は期待される範囲内であった。コロニー形成数は施設間差が大きかった。無菌検査の評価を行い、新基準を策定した。抗 HLA 抗体の移植結果に及ぼす意義について明らかにした。

A. 研究目的

臍帯血の調製保存手技や検査について、基礎データを示しつつ、11バンクの合意を得て手順を統一し、臍帯血の品質標準化を目指す。造血細胞関連検査については多施設比較試験を行い、臍帯血バンクのデータに対する認識を深め信頼を得る。また臍帯血移植の安全性向上の為にレシピエント抗 HLA 抗体と移植結果について後方視的検討を行い、その意義を明らかにする。

B. 研究方法

(1) 凍結検体による多施設比較試験：同一凍結臍帯血検体を各調製保存施設へ送付し、白血球数、有核赤血球率、生細胞率、CD34+細胞数、およびコロニー形成細胞数 (CFU 数) を算定した。(2) 臍帯血バンク技術者によるコ

ロニーアッセイについての研修を行った。(3) 無菌検査法の検討を行った。(4) レシピエント抗 HLA 抗体が移植結果に及ぼす影響について、後方視的検討を行った。

(倫理面への配慮)

(1) (2) および (3) に用いた臍帯血は臍帯血バンクの基準により移植用として保存できないものを用いた。移植に用いることができない場合の基礎検討への転用についてはドナーより同意を得ている。(4)については当血液センターの研究課題として日本赤十字社血液事業部研究倫理審査委員会にて承認された。

C. 研究結果

(1) 凍結検体による多施設比較試験：2008年11月および2009年12月に凍結検体を日本さい帯血バンクネットワーク参加全バンクに

配布した。白血球数 CV 値は各々4.1%と6.3%であった。TB法による生細胞率は各々15.6%と11.6%、AO/EB法では各々8.8%と4.2%、7AAD法では各々18.7%と20.1%であった。CD34+細胞数は算定法をCD34+/45+分画に加え標準ビーズから測定容量を算出し、かつ死細胞除去 gating をかける方法とした場合 CV 値が各々15.8%と28.7%であった。総コロニー形成細胞は各々40.7%と43.7%、CFU-GM は各々44.5%と57.8%であった。

(2) コロニーアッセイ研修会：平成20年度および21年度それぞれ15施設、11施設の検査担当者が参加し、画像による座学研修の後、同じ検体のコロニー算定を行った。算定値の CV 値は総コロニー形成細胞は13.3%-21.9%、CFU-GM は18.5%-26.2%であった。

(3) 無菌検査法の評価：平成20年度にBSL2設定をした3施設において培地と接種容量の検討を行った。最終産物である凍結前臍帯血による無菌検査は最低接種量0.5mL、更に調製過程で除去される赤血球層5-10mLを用いて無菌検査を行うことで感度を補完することが適当と判断した。続いて「日本さい帯血バンクネットワーク」の基準書を改訂した。

(4) 抗HLA抗体の生着に及ぼす影響：北海道、東京、東海大学、兵庫、京阪、福岡県および東京都赤十字血液センター臍帯血バンクにて保管した移植患者血清を用いて900件以上のレシピエント抗HLA抗体の有無とその特異性を調べた。血液腫瘍性疾患の初回単一臍帯血移植、骨髄破壊的前処置の386例について生着を含む予後を解析した。抗HLA抗体(抗class I and/or 抗class II)陰性

(ab-negative) 297例、陽性だが抗体特異性が移植臍帯血HLA抗原に対応しない(ab-positive) 69例、陽性かつ抗体特異性が移植臍帯血HLA抗原に対応する(positive-vs-CB) 20例であった。抗体陽性群は女性、疾患ではMDSが多かった。単変量解析にて抗HLA抗体は好中球回復、血小板回復、無イベント生存率および粗生存率に有意に影響した。多変量解析にて好中球回復ではab-positive群とpositive-vs-CB群、血小板回復ではpositive-vs-CB群、再発ではab-positive群、無イベント生存率ではab-positive群とpositive-vs-CB群、粗生存率ではpositive-vs-CB群にて有意であった。患者血清中HLA抗体の生着にあたる影響は、移植造血細胞数、即ちCD34数が少ない場合により顕著であった。

D. 考察

臍帯血バンクの検査手技は施設によって異なる場合がある。同一検体を配布する多施設比較試験は昨年度に引き続き凍結検体を配布した。有核細胞数算定は機器管理用の標準血球測定と同様の精度で安定していると考えられる。生細胞率については数種類の方法が使われている。CD34+数測定はCD34, CD45に死細胞除去を加えても3割ほどの変動が認められた。コロニー形成細胞数のうちCFU-GM測定は施設間では5割ほども変動する。担当者の計数の指標を統一すべく開催した研修会ではCFU-GMのCV値が2-3割となった。研修参加者が自施設で必ずしもすべての検査を行う訳ではなく、研修の経験が実務に反映されるに

は時間がかかると考えられた。

無菌検査には日本薬局方収載のものから多数検体自動判定システムまで多くの方法があり、各バンクによって異なる。検出感度をあげる為に臍帯血の最終産物以外に赤血球層 5mL 以上を用いて無菌検査を行うことが望ましいと結論し「日本さい帯血バンクネットワーク」の基準書を改訂した。

レシipient抗 HLA 抗体については、抗体が陽性であれば有意に生着に不利であることが示され、患者 HLA 抗体が陽性である場合には、臍帯血との HLA 不適合抗原がその抗体と反応しないように臍帯血を選択して移植を施行することにより、生着不全の危険性を回避することが期待できると考えられた。同時に輸注 CD34+数の重要性も示された。移植前の抗 HLA 抗体の検査について、その重要性を確認するとともに診療報酬を定めることも考慮すべきと考える。

E. 結論

白血球数測定の方法は統一され、精度は許容範囲と考えられる。CD34+数、CFU 数の精度はやや低い。無菌検査の基準を改定した。今後は検査法のみならず調製保存手技についても統一を進めるべきである。移植成績に及ぼすレシipient抗 HLA 抗体の意義について、骨髄破壊的前処置を受けた移植例に限定して解析し、抗体、特にその特異性が臍帯血抗原と一致する場合には更に、生着に不利であった。抗 HLA 抗体が陽性の場合には抗体特異性によって、同時に細胞数 (CD34+細胞数) を重視して臍帯血を選択することが重要である。

予後に及ぼす影響の大きい検査については診療報酬を定めることも必要と考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

・ Letter to the Editor: The impact of HLA antibodies on engraftment of unrelated cord blood transplants. *Transfusion* 48:791-792

・ The impact of anti-HLA antibodies on unrelated cord blood transplantations. *Blood*. 2010;116(15):2839-2846.

・ Red blood cell depletion of cord blood using an automated system - Evaluation of the AXP system. *日本輸血細胞治療学会誌* 2010 Feb;56(1):62-67.

・ A suggested total size for the cord blood banks of Japan. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Sept. 20. [Epub ahead of print]

学会発表

・ 臍帯血採取後調製までの保管温度と時間の検討。第 56 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2008 年 4 月 25-27 日、福岡) *日本輸血細胞治療学会誌* 54(2):209, 2008

・ 東京都赤十字血液センター臍帯血バンクにおける移植例追跡調査について。第 32 回日本血液事業学会総会 (2008 年 10 月 2-4 日、大阪) *血液事業* 31 (2) :236, 2008

・臍帯血移植における輸注時即時反応について. 第 70 回日本血液学会総会 (2008 年 10 月 10-12 日、京都) 臨床血液 49 (9) :276, 2008

・Quality control of cord blood banking. 第 35 回日本低温医学会総会シンポジウム (2008 年 11 月 22-23 日、東京)

・臍帯血移植における抗 HLA 抗体の影響. 第 31 回日本造血細胞移植学会総会 (2009 年 2 月 5、6 日、札幌)

・自動細胞分離装置 SEPAX による臍帯血調製の検討. 第 57 回日本輸血・細胞治療学会総会、口演 0-080 (2009 年 5 月 28-30 日、大宮) 日本輸血細胞治療学会誌 55 (2) :258, 2009

・“製品”としての血液の品質確保. 第 8 回日本組織移植学会総会学術集会 S-4(2009 年 8 月 29 日、東京) 日本組織移植学会雑誌 8(1) :32, 2009

・臍帯血移植における抗 HLA 抗体の影響. 第

18 回日本組織適合性学会大会、S3-2 (2009 年 9 月 25-27 日、名古屋) 日本組織適合性学会誌 16 (2) :58-59, 2009

・東京都赤十字血液センター臍帯血バンクにおける提供前検査について. PS-1-245 (2009 年 10 月 23-25 日、第 71 回日本血液学会学術集会、京都) 臨床血液 50 (9) :418(1110), 2009

・臍帯血バンクにおける品質向上への取り組み. 第 16 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム、第 33 回日本血液事業学会総会、第 20 回国際輸血学会アジア部会 (2009 年 11 月 14-18 日、名古屋) 血液事業 32 (2) :232, 2009

H. 知的所有権の出願・取得情報

なし

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 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

研究分担者 高橋 聡 東京大学医科学研究所・先端医療研究センター・血液腫瘍内科 准教授
研究協力者 渡辺 信和 東京大学医科学研究所・幹細胞治療センター 特任准教授

研究要旨：我々は、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（ASHmAb）がフローサイトメトリーで利用できることに注目し、HLA ミスマッチ造血細胞移植後の新規キメリズム解析法（HLA-Flow 法）を開発した。本法は、生着不全や再発の早期診断に極めて有用で優れた特徴がある一方、未だ臨床検査法として定着するには至っていない。本研究では我々は新たに ASHmAb を作製する方法を開発し、我が国で比較的頻度の高い HLA に対する抗体の作製を試み、HLA-Flow 法の適応率と解析能の向上を目指した。また、従来からの STR-PCR 法と比較すると共に、HLA-Flow 法の抗体による染色性についての問題点を検討し、本法の改善を目指した。

A. 研究目的

本研究ではアリル特異的抗 HLA モノクローナル抗体（ASHmAb）に関する諸問題を解決する目的で、新たに ASHmAb を作製する方法を開発し、我が国で比較的頻度の高い HLA に対する抗体の作製を試み、HLA-Flow 法の適応率と解析能の向上を目指した。また、従来からキメリズム解析に用いられている STR-PCR 法と比較するとともに、さらに HLA-Flow 法の抗体による染色性についての問題点を検討し、本法の改善を目指した。

B. 研究方法

ヒト HLA 分子上の異種タンパク・エピトープに対する抗体産生を抑制するため、ヒト HLA-B51 トランスジェニックマウスに異なるヒト HLA のテトラマーを免疫した。マウスの B 細胞からハイブリドーマを樹立し、産生する抗体を HLA 抗原コーティングビーズに吸着させ、フローサイトメーターでスクリーニングした。選択された ASHmAb は、さらにヒトリンパ球に対する染色性をフローサイトメーターで確認した。次に、臍帯血移植における HLA の一致度と本解析法の適応率との関係、さらに解析をしばしば困難にする染色上の問題点について整理し、さらに本法と STR-PCR 法との比較検討を行った。また、虎の門病院との共同研究における臍帯血ミニ移植後早期のキメリズム解析により、解析をしばしば困難にする染色上の問題点について整理した。

C. 研究結果

HLA-A2 と HLA-B35 のテトラマーで免疫した結果、それぞれ 672 個と 288 個のハイブリドーマが樹立された。ビーズを用いたスクリーニングの結果、HLA-A2 では 3/672 個が、HLA-B35 では 1/288 個が目的とする特異抗体であった。ヒトリンパ球を用いてフローサイトメーターでの染色性を確認したところ、いずれの抗体も良好な特異性と染色性を示した。

HLA-Flow 法によるキメリズム解析をしばしば困難にする染色性の原因としては、白血球のサブポピュレーションごとに HLA の発現レベルが異なることや自家蛍光や抗体の非特異的結合により”Double positive”にみえる、などの要因が関与していた。STR-PCR 法との比較検討した結果、14 例中 9 例では、移植後 1、2 週目に HLA-Flow 法は STR-PCR 法の 50%以下のレシピエント由来細胞の頻度を示した。また、生着が確認された 11 例では、3 週目にレシピエント由来細胞の頻度は両解析法ともほぼ 0%になった。一方、残りの 3 例中、1 例は 3 週目に死亡し、1 例では 3 週目以降キメリズムが遷延したが、両解析法の結果は良い相関を示した。さらに、再発した 1 例の患者では、移植後 2 週目と 3 週目に HLA-Flow 法でレシピエント由来細胞を検出したが（それぞれ 23.2%と 13.0%）、STR-PCR 法ではレシピエント由来細胞は検出されなかった。白血球細胞の監視を目的に行った骨髓細胞のキメ

リズム解析では、経時的に解析することで両解析法とも再発の診断が可能であったが、再発した4例中1例で、STR-PCR法と比べてHLA-Flow法でのレシピエント由来細胞の頻度が有意に低かった。

さらに、市販の抗HLA-A2抗体(BD Pharmingen社、クローン:BB7.2)はHLA-A*0201やA*0206陽性の白血球を染色可能であるが、A*0210陽性の白血球は全く染色しないことが判明した。また、抗HLA-B13,15抗体(One Lambda社、クローン:IH0129)はHLA-B62(B15)陽性の白血球を染色可能であるが、同じB15のスプリット抗原であるB75陽性の白血球は全く染色しないことが判明した。

D. 考察および結論

我々が新規に開発した方法でASHmAbの作製を試みたところ、普通のマウスに直接ヒトHLAを免疫した場合に比べ、極めて効率よく抗体を作製することに成功した。染色性の問題に対する解決法として、特徴的な染色パターンに慣れる、抗体の非特異的結合を防ぐ、ドナーとレシピエントの単独細胞を、それぞれ別個に染色する、染色性の良好なIgG型の抗体に替える、などの方法を考えている。単核細胞分画を用いた2カラーのHLA-Flow法は、STR-PCR法と同様に生着不全や再発の診断に利用できるが、短時間(1.5時間以内)に結果を得られるため、より有用な方法といえる。ASHmAbの特異性は、古くより知られている経産婦血清由来の抗HLAポリクローナル抗体の特異性とほぼ一致しており、HLA血清学タイピング(リンパ球障害テスト)の過程で判明した交叉反応性グループ(cross reactive group, CRG)に従っている。しかしながら、現在までにすべてのHLA型に対するASHmAbの染色性をフローサイトメーターで調べた仕事はほとんどなく、今回報告したように予測できない染色性を示す可能性もある。今後我が国でHLA-Flow法を広く普及させるためには、頻度の高いHLAに対するASHmAbの染色性を、網羅的に検証しておく必要がある。本法で使用されているASHmAbは、おもに米国One Lambda社と英国Ab-D Serotec社で作製されたモノクローナル抗体であるが、それらの特異性はHLA血清学タイピング(リンパ球障害テスト)に使用されていた経産婦血清が示す特異性とほぼ一致している。そのことは、ASHmAbと経産婦血清に含まれる抗HLAポリクローナル抗体が、HLA分子上の同じエピトープを認識していることを示唆している。

E. 結論:

今後、本抗体作製法により、我が国で頻度が高いHLAでまだASHmAbが作製されていないA33、B61、B48/60、B22、B16、B46に対する抗体を順次作製する計画である。これらの抗体が利用可能になれば、我が国におけるHLA-Flow法の適応率および解析能

が大幅に向上することが期待される。また、より定量的な解析を行なうためには、全血をそのまま染色して顆粒球系の細胞も同時に解析することが必要である。これらの問題が解決されれば、我が国におけるHLA-Flow法の適応率および解析能が大幅に向上することが期待される。さらに、HLA-Flow法によるキメリズム解析を混乱させる原因の一つとして、ASHmAbの反応性の不確実さが明らかになった。

F. 研究危険情報

特になし

G. 発表

1. **Takahashi S, N Watanabe, Ishige M, Ishi Y, Ooi J, Tomonari A, Tsukada N, Konuma T, Kato S, Sato A, Tojo A, Nakauchi H.** Dynamic analysis of chimerism after HLA-mismatched cord blood transplantation elucidated by 9-color FACS: implications for early detection of engraftment failure and relapse. *Biol Blood Marrow Transplant*, 14(6):693-701, 2008.

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
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 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

研究分担者 谷口 修一 国家公務員共済組合連合会 虎の門病院 血液内科 部長

研究要旨 臍帯血ミニ移植は、高齢者造血器疾患患者に治癒をもたらさう有望な治療法であるが、移植後早期の非再発死亡が高頻度であることが問題である。移植後早期の生着前免疫反応(PIR)が、非再発死亡と密接に関与することが明らかとなった。虎の門病院での臍帯血移植例の後方視的研究で、未熟と考えられていた臍帯血由来のリンパ球が、移植後極めて早期から増殖することが明らかとなった。また、ミコフェノール酸をGVHD予防に用いることで、早期死亡が減少することが示された。近年の臍帯血移植成績が、非再発死亡の減少と、全生存率が改善していることが示され、これらの試みが奏功していることが示された。

A. 研究目的

日本国内の臍帯血移植の多くは、50歳以上の比較的高齢者になされるが、同種移植の治療関連毒性は、年齢が高いほど発生率が高まることが知られており、治療に伴う毒性の軽減が、成績向上の為に重要である。臍帯血ミニ移植においては、移植後早期の生着前に特有の臨床症状を伴う生着前免疫反応(Pre-engraftment immune reactions, PIR)を発症することが言われている。このPIRは、臍帯血ミニ移植後9日目を中央値とする生着前に、発熱・皮疹・黄疸・下痢・腎障害・体重増加などを呈する一種のGVH反応であり、これがGVHDや感染症、臓器障害を引き起こし、移植後早期の全身状態悪化に密接に関連することが示されている。高齢者において、PIRを含む治療関連毒性を克服することを、本研究の目的とする。

B. 研究方法

① Tacrolimus (Tac) + mycophenolate mofetil (MMF) によるGVHD予防法の検討：虎の門病院で

GVHD予防として Tac + MMF を用いて 2005 年 12 月から 2008 年 12 月までの期間に臍帯血移植をいった 45 名を対象として、後方視的に生着(好中球回復)率、累積非再発死亡率、全生存率、無イベント生存率について検討した。

②臍帯血移植後の血球回復カイネティクスの検討：2007 年 6 月から 2009 年 2 月の間に虎の門病院で fludarabine (Flu) を含む初回臍帯血移植を受けた患者 109 名について、移植後早期の好中球・リンパ球回復のカイネティクスを検討した。ドナー臍帯血の HLA 抗原に対する HLA 抗体を有する例、30 日以内の早期死亡例、生着前に原疾患の再発・進行があった例は除外して、47 名を対象とした。同時期に非血縁骨髄移植 (UBM) を受けた 26 名中、同様の除外基準を適応して 21 名をコントロールとした。

③高齢者臍帯血移植成績の時代変遷：時代とともに高齢者への臍帯血移植の成績が向上しているか否かについて、2002 年 1 月から 2010 年 8 月の間に虎の門病院で初回臍帯血移植を実施した患者 147 名を対象に、2002~2006 年と 2007~2010 年の 2 群間で後

方視的に好中球生着率、全生存率、無イベント生存率、累積再発率、累積非再発死亡率を比較検討した。なお、前治療開始時に活動性感染症を有したり、Performance status (PS) 4 の患者は除外して、計 114 名が解析対象となった。

(倫理面への配慮) MMF は造血幹細胞移植においては国内未承認薬であるが、すでに腎・心・肺・肝などの臓器移植においては承認されて広く使用されている。投与に際しては十分な説明と同意の取得、及び安全性の評価を行う。試験参加患者は直ちに連結不能な暗号化がなされ、当該分担研究者によって厳格に管理された。

C. 研究結果

① Tac + MMF による GVHD 予防法の検討: 55 歳以上で PS 0-2 の患者 45 名を対象とした。AML/MDS が 35 名、ALL 2 名、ML 3 名、CML 2 名、SAA 3 名で、疾患病期は標準リスクが 11 名、高リスクが 34 名であった。移植後 60 日までの累積生着達成率は 84.4% と高率で、移植後 4 週目までの累積非再発死亡率は 2% と低かった。100 日以内の死亡 15 名中 9 名が非再発死亡で、6 名が再発死亡、100 日以降では 8 名中 3 名が非再発死亡、5 名が再発死亡であった。血球貪食症候群や、生着前の感染症死亡は認めなかった。非再発死亡の内訳は肺合併症 7 名、GVHD 3 名、生着不全 1 名、感染症 1 名であった。2 年の全生存率・無イベント生存率はそれぞれ 37%、24% であった。

② 臍帯血移植後の血球回復カイネティクスの検討: 臍帯血移植 (UCB) 群 47 名は年齢中央値 62 歳で、AML/MDS 35 名、ALL 1 名、MPD 2 名、ML 8 名、ATL 1 名であった。UBM 群 21 名は年齢中央値 59 歳で、AML/MDS 13 名、ALL 2 名、ML 5 名、ATL 1 名であった。GVHD 予防は UCB 群で 42 名が Tac + MMF、5 名が Tac 単独で、UBM 群は 20 名が Tac + MTX、1 名が Tac + MTX + MMF であった。好中

球 $\geq 500/\mu\text{l}$ までの到達期間は CB 群で 22 (13-43) 日、UBM 群で 20 (16-41) 日と有意差を認めなかった ($P=0.17$)。一方、リンパ球回復 (リンパ球数 $\geq 100/\mu\text{l}$) までの期間は CB 群で 15.5 (10-37) 日、UBM 群で 20 (13-29) 日と、CB 群で回復が早い傾向にあった (移植後 day 20 の時点では $P=0.02$ 、day 60 まででは $P=0.79$)。ドナー・レシピエントキメラリズムを全血・全骨髄細胞で解析したところ、CB 群で移植後 14 \pm 7 日にキメラリズム検査を実施した 25 名全員が $>90\%$ 以上ドナー型であり、早期回復するリンパ球はドナー由来であった。UBM 群では移植後 14 \pm 7 日に検査した 6 名全員で $>90\%$ ドナー型であった。また、医科学研究所との共同検討の結果、臍帯血の T 細胞は、移植前はほとんど naïve T 細胞であるが、移植後 7 日目の時点ですでにその過半数は memory T 細胞形質を獲得していることが観察された。

③ 高齢者臍帯血移植成績の時代変遷: 前期 (2002-2006 年 56 名) と後期 (2007-2010 年 58 名) は、それぞれ年齢中央値が 65 歳と 64 歳、前期で ML を含む割合が多かった (21% vs 10%, $P=0.049$)。GVHD 予防法は、前期で Cyclosporine A (CsA) 単独・Tac 単独 (計 50 名) が多く、後期で Tac + MMF (57 名) が多かった ($P<0.05$)。移植前治療は前期で Flu+melfalan+TBI (54 名) が多く、後期で busulfan を含む前治療 (計 33 名) が多かった ($P<0.05$)。累積好中球回復率は前期で 78.6%、後期で 75.9% と有意差は無かったが、1 年の全生存率・無イベント生存率は、前期でそれぞれ 20%・12.2%、後期で 51%・34% と、共に有意に後期が良かった ($P=0.002$, 0.004)。生存に寄与する因子として、疾患病期 (標準 $>$ 高リスク, $P=0.036$)、及び GVHD 予防法 (Tac + MMF $>$ それ以外, $P=0.0007$) であった。

D. 考察

高齢者に対する臍帯血移植の、高い非再発死亡を克

服するために、Tac + MMF による GVHD 予防が、移植後早期の重篤な PIR を抑制することで、生着達成率を改善し、生存率の向上に寄与していることが明らかとなった。さらに、臍帯血由来の T 細胞は、移植後極めて早期から非常に active に増殖し、しかも移植後 2 週間前後でほとんどの患者で完全ドナー型キメラとなっており、ホストの造血細胞・免疫担当細胞を極めて短期間のうちに凌駕・駆逐してしまうことが明らかとなった。臍帯血移植後の高い生着不全が、臍帯血の T 細胞が機能的に未熟で拒絶されるためと想像されていたが、本研究結果はそれと全く相反するものであった。即ち、生着の過程は単なるドナー-vs.レシipientの競合ではなく、ドナー由来リンパ球による hyperimmune reactions と引き続き起こる血球貪食症候群などの造血障害がより重要であると考えられた。また、移植後極めて早期から臍帯血由来の naïve T 細胞が memory 細胞へと機能的に成熟している可能性が示唆され、臍帯血移植後の再発率が、骨髄や末梢血移植と比べて必ずしも多くないことも、臍帯血 T 細胞の機能的な能力の高さを間接的に示すものである。

E. 結論

高齢者を対象とした臍帯血ミニ移植は、MMF を用いた GVHD 予防により、移植後早期に発症する重症 PIR をコントロールでき、改善することが示された。臍帯血内の T 細胞が、移植後極めて早期から、active に増殖と機能的成熟をしていることも分かってきた。年代別の高齢者移植成績の向上から、生存率にも十分寄与できることが示されており、現時点で国内で未承認の MMF が、一刻も早く本邦に導入され、より多くの患者群に利益をもたらすことが期待される。

F. 健康危険情報（分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入）：該当なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Yamamoto H, Kato D, Uchida N, Ishiwata K, Araoka H, Takagi S, Nakano N, Tsuji M, Asano-Mori Y, Matsuno N, Masuoka K, Izutsu K, Wake A, Yoneyama A, Makino S, Taniguchi S. Successful sustained engraftment after reduced-intensity umbilical cord blood transplantation for adult patients with severe aplastic anemia. *Blood*. 2011.
2. Takagi S, Ota Y, Uchida N, Takahashi K, Ishiwata K, Tsuji M, Yamamoto H, Asano-Mori Y, Matsuno N, Masuoka K, Wake A, Miyakoshi S, Ohashi K, Taniguchi S. Successful engraftment after reduced-intensity umbilical cord blood transplantation for myelofibrosis. *Blood*. 2010;116:649-652.
3. Masuoka K, Uchida N, Ishiwata K, Takagi S, Tsuji M, Yamamoto H, Seo S, Matsuno N, Wake A, Makino S, Yoneyama A, Taniguchi S. What is the upper age limit for performing allo-SCT? Cord blood transplantation for an 82-year-old patient with AML. *Bone Marrow Transplant*. 2010.
4. Yamamoto H, Uchida N, Ishiwata K, Araoka H, Takagi S, Tsuji M, Kato D, Matsuhashi Y, Seo S, Matsuno N, Masuoka K, Wake A, Yoneyama A, Makino S, Taniguchi S. "Possible graft-versus-host disease involving the central nervous system soon after cord blood transplantation" *Am J Hematol*. 84:764-766, 2009.
5. Takagi S, Masuoka K, Uchida N, Ishiwata K, Araoka H, Tsuji M, Yamamoto H, Kato D,

- Matsuhashi Y, Kusumi E, Ota Y, Seo S, Matsumura T, Matsuno N, Wake A, Miyakoshi S, Makino S, Ohashi K, Yoneyama A, Taniguchi S. “High incidence of haemophagocytic syndrome following umbilical cord blood transplantation for adults” *Br J Haematol*. 147:543-553, 2009.
6. Matsuno N, Wake A, Uchida N, Ishiwata K, Araoka H, Takagi S, Tsuji M, Yamamoto H, Kato D, Matsuhashi Y, Seo S, Masuoka K, Miyakoshi S, Matsuno S, Yoneyama A, Kanda Y, Taniguchi S. “Impact of HLA disparity in the graft-versus-host direction on engraftment in adult patients receiving reduced-intensity cord blood transplantation” *Blood*. 114:1689-1695, 2009.
7. 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*. 15:439-446, 2009.
8. 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* 113:1631-1638, 2009.
9. Kim SW, Mori SI, Tanosaki R, Fukuda T, Kami M, Sakamaki H, Yamashita T, Kodera Y, Terakura S, Taniguchi S, Miyakoshi S, Usui N, Yano S, Kawano Y, Nagatoshi Y, Harada M, Morishima Y, Okamoto S, Saito AM, Ohashi Y, Ueda R, Takaue Y. “Busulfex (i.v. BU) and CY regimen before SCT: Japanese-targeted phase II pharmacokinetics combined study” *Bone Marrow Transplant*. 43:611-617, 2009.
10. Uchida N, Wake A, Takagi S, Yamamoto H, Kato D, Matsuhashi Y, Matsumura T, Seo S, Matsuno N, Masuoka K, Kusumi E, Yuji K, Miyakoshi S, Matsuzaki M, Yoneyama A, Taniguchi S. Umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning for elderly patients with hematologic diseases. *Biol Blood Marrow Transplant*. 14:583-590, 2008.
11. Kusumi E, Kami M, Hara S, Hoshino J, Yamaguchi Y, Murashige N, Kishi Y, Shibagaki Y, Shibata T, Matsumura T, Yuji K, Masuoka K, Wake A, Miyakoshi S, Taniguchi S. Postmortem examination of the kidney in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients: possible involvement of graft-versus-host disease. *Int J Hematol*. 87:225-230, 2008.

学会発表

1. 内田直之、石綿一哉、辻正徳、高木伸介、山本久史、加登大介、瀬尾幸子、松野直史、増岡和宏、和気敦、内田ゆみ子、伊藤忠明、米山彰子、牧野茂義、谷口修一 「静注ブスルファンを用いた臍帯血ミニ移植成績の単施設後方視的検討」 第70回日本血液学会総会（京都）
2. Uchida N, Yamamoto H, Matsuno N,

Ishiwata K, Tsuji M, Takagi S, Araoka H, Kato D, Yoshimi M, Seo S, Masuoka K, Wake A, Narita M, Sagawa K, Yoneyama A, Makino S, Taniguchi S. “Pre-Transplant Conditioning Using Intravenous Busulfan Is a Feasible and Effective Option in Reduced-Intensity Cord Blood Transplantation.” American Society of Hematology, 50th annual meeting (San Francisco, California)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
 該当なし
2. 実用新案登録
 該当なし
3. その他
 該当なし

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 成人における臍帯血移植（骨髄破壊的前処置法の標準化）

研究分担者 田野崎 隆二 国立がん研究センター中央病院 病理科・臨床検査科副科長

研究要旨

成人における骨髄破壊的前処置を用いた臍帯血移植技術の標準化を目的に「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）」を進行中である。18施設が各施設倫理委員会の承認を得て、平成20年8月から本登録13例（他に仮登録2例）で移植が進行中である（予定症例登録数28例）。進捗状況が遅いことを検討した結果、移植事情が少し変化し本研究に適応となる症例が予想以上に少ないことが判明した。臍帯血移植技術の向上と均てん化を図ることは極めて重要な課題であるので、登録期間を2年間延長して継続する予定である。

A. 研究目的

ヒト主要組織適合抗原(HLA)が一致する適切な血縁ドナーがない場合の同種造血幹細胞移植では、骨髄バンクを介した非血縁者間造血幹細胞移植が一般的に行われるが、登録から移植実施までに3～6ヶ月は必要で、また必ずしも適切なドナーが見つからないこともある。臍帯血移植は、HLAが必ずしも一致しなくても重症の移植片対宿主病(GVHD)の頻度は必ずしも高くなく、また凍結保存がされているために登録後にすぐに移植できることから、血縁ドナーが不在である場合に、骨髄バンクドナーに代わる幹細胞源として期待されている。東京大学医科学研究所（以下、東大医科研）単施設の後方視的研究報告では、比較的若年の造血器腫瘍患者における標準的な強度の前処置を用いた臍帯血移植では、非血縁ドナーと比較して単一の臍帯血を用いた移植成績が優るとも劣らなかった。けれども、海外から他にいくつかの臍帯血移植の成績が報告されているが、医科研の臍帯血移植の成績は突出して優れている。

そこで、本研究の目的は、医科研の移植法を多施設で追試・検証することにより、移植技術の向上と均てん化を図ることとした。

B. 研究方法

(1) 臨床試験のデザイン

対象は同種造血幹細胞移植の適応となる成人造血器悪性腫瘍で、東大医科研と同様の患者選択基準を設定した。移植前処置は全身放射線照射とシクロホスファミド大量および顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)併用キロサイド大量療法で、GVHD予防や支持療法は可能な限り東大医科研と同様の方法とし、症例ごとに同施設の医師が相談にのり、必要に応じて研究計画書などに反映させることとした。

主要評価項目は移植後1年における無イベント生存割合とし、予定症例数28例、登録期間3年間の多施設第Ⅱ相試験とした。また、データセンターは血液疾患臨床研究サポートセンター(C-SHOT)に委託した。

(2) 東大医科研の臍帯血移植方法の解析

成人に対する標準的な強度の前処置を用いた単一臍帯血を用いた同種移植療法については、当初、欧米からの報告はいずれも100日以内の移植関連死亡割合が高く、東大医科研の成績に比較して生存割合などが著しく劣っていた。本研究に先立ち、東大医科研医師らと打ち合わせを行い、成績の差異が出る理由について検討し、当該施設で独自に採用している適格条件や移植方法をなるべく詳細に実施計画書に記載して反映させるように努めた。

具体的には、対象症例については、図1に示すように疾患により移植時病期に制限があることが判明した。すなわち、急性リンパ性白血病では非寛解例は含まず、

慢性骨髄性白血病では急性転化での移植は適応とならない。移植前の治療においても独自の条件が設定されていた。すなわち、骨髄異形成症候群では化学療法では寛解に入りやすく、その一方で感染症などの合併症を来しやすいことから、初回に強力な抗がん剤治療を行わず、病勢をある程度コントロールできるならば直接前処置を行い、臍帯血移植を実施する。また、骨髄異形成症候群から進展した急性骨髄性白血病でも必ずしも寛解に入れるための治療は行わず、芽球の増加率が乏しい場合には直接前処置を行い、臍帯血移植を実施する。また、適切な血縁ドナーがいなければすぐに臍帯血移植を行うこととし、非血縁ドナー検索に時間を費やすことのないように設定した。以上により、早期にかつ最適時に臍帯血移植を行うことが可能となり、移植前の化学療法による副作用や感染症の合併などを最小限に抑えることが可能になる。これにより、臍帯血移植における最大の問題点であった移植後100日以内の感染症などによる移植関連死亡を極力抑えることが可能になると期待される。

移植前処置に関しては、特に骨髄球系の急性白血病や骨髄異形成症候群などのように腫瘍細胞が顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)受容体を有することが推測される場合には、腫瘍細胞の細胞周期への動員効果を狙ってG-CSFを同時投与しながら細胞周期特異的に作用するキロサイド(Ara-C)大量と全身放射線照射、および大量シクロホスファミド(CPA)による前処置を行う点が特徴的である。これにより抗腫瘍効果を高めるとともに、特に強力な骨髄抑制を図ることにより、生着不全の比較的多い臍帯血移植の生着率を高めることが図られている。また、このように強力な骨髄破壊的前処置法を行うことにより、骨髄系腫瘍に関しては移植前に完全寛解にすることにこだわらなくとも再発率を最小限に抑えることができる可能性がある。

臍帯血移植においてはHLA A, B, DRのうち2抗原不一致であっても移植片対宿主病(GVHD)は管理可能と報告されている。けれども、一般的にGVHD予防目的の免疫抑制剤の使用法は多くの施設間で同一ではなく注意が必要である。すなわち、本プロトコールではGVHD予防法としてシクロスポリン 10 時間静脈投与および短期メトトレキサート(MTX) 15 mg/m² (第1日目), 10

mg/m² (第3, 6日目)を行い、MTX投与後には口内炎の副作用を予防する目的でロイコポリンによるレスキューを行う。シクロスポリンは3 mg/kg (患者体重) / 日の初回量から開始して血中濃度最低値(トラフ濃度)により用量調整を行う。このような医科研の方法と対照的に、近年多くの施設で行われているGVHD予防法は、プログラフを用いたり、シクロスポリン24時間持続点滴投与でトラフ濃度により用量調節を行う方法である。このシクロスポリン投与方法では血中ピークが出来ないために1日の総投与量や本薬剤の薬効に最も関係するとされるAUC(濃度曲線下面積)が明らかに低くなる。また、MTXは10 mg/m² (第1日目), 7 mg/m² (第3, 6日目)に減量している施設も多い。以上のように、医科研の方法ではGVHD予防も旧来の方法により比較的強力に行われている。

更に、臍帯血移植では急性GVHDの多くが皮膚のみに局限していることから、GVHDの重症度が進んでも(Grade II以上であっても)ステロイドホルモンの全身経静脈投与は極力避け、ステロイド含有軟膏塗布やハイドロコチゾンなど短時間作用型のステロイド剤で治療する。これにより、ステロイドホルモン長期全身大量投与に伴う感染症などの合併症を最小限に抑えることが期待される。また、抗生剤や抗真菌剤などの支持療法も早期から強力に行われる。

以上のように、医科研の方法では、早期の臍帯血移植により合併症の少ない良好な全身状態での移植が可能になり、強力な前処置により再発や生着不全を最小限に抑え、強力なGVHD予防によりGVHDを少なく抑え、ステロイドの大量全身投与を避けることにより感染症やその他のステロイドに起因する合併症を最小限にしている。これにより、100日以内の移植関連死亡を最小限にすることが図られている。

C. 研究結果

(1) 登録状況など

登録期間3年のうち2年半経過した現時点で、計18施設が各施設倫理委員会(IRB)の承認を得て参加している。登録状況は表1に示すように本登録が計13例(仮登録計15例)である。症例記録用紙の回収についてはほぼ適切に行われている(表2)。プロトコール中止は

移植後再発に対して行われた再移植後早期死亡(1例)と、移植前に中枢神経浸潤が判明して不適格とされた症例(1例)の計2例であった(表3)。一方、これまでに重篤な有害事象として HHV-6 脳炎疑い(1例)と原疾患の再発による死亡(1例)の計2例が報告されたが、前者は臍帯血移植後に起こり得る合併症として一般に認識されていること、後者は臍帯血移植と因果関係がないと判断された(表4)。

(2) 症例登録推進のための工夫

開始後は症例登録が少ないことから、本来の目的にそれることのないように留意しながら計画書の改訂を数点行った。すなわち、

- ① 急性白血病予後不良群の定義があいまいであったので、米国 SWOG/ECOG の基準を参考に「del(5q)/5, 7/del(7q), abn 3q, 9q, 11q, 20q, 21q, 17p, t(6;9), t(9;22) および複雑核型」の染色体異常を有する急性白血病も適応に加えた、
- ② 総ビリルビンが肝臓由来でないことが臨床的にほぼ確実である場合には登録可とした、
- ③ 患者が抗 HLA 抗体陽性の場合は、これと反応しない種類の HLA 抗原の臍帯血ユニットであれば登録可とした。また、抗 HLA 抗体検査に関しては施設間差をなくすために仮登録後に研究班で施行することにした。

また、途中で、参加施設を対象に、各施設における臍帯血フル移植の状況、登録できなかった症例があった場合にはその理由、今後の本研究の対策についてアンケート調査を行った。その結果は、すでに血縁および骨髄バンクによる造血幹細胞移植が確立した治療法となっている現状では、まだその安全性や有効性が十分に明らかになっていない臍帯血移植を第1選択とすることは難しく、適応となる症例が少ないと多くの施設で考えられていることが明らかになった。けれども、回答のあった全施設からは、本臨床試験が重要であり今後とも継続すべきであるとの意見であった。

また、新たな参加施設の呼びかけも行い、登録ペースは遅いものの、少しずつ集積されている。平成 23 年 8 月に登録予定期間が終了するが、本臨床試験は重要であるとの認識から、本臨床試験の登録期間を 2 年間延長することが検討された。この場合、現在の症例

登録ペースはほぼ予想ペースにのっている(図2)。

D. 考察

東大医科研の臍帯血移植の成績は欧米に比較して著しく良好であり、骨髄バンクを介する移植法などに勝るとも劣らない可能性がある。これについては、医科研独自の症例選択や移植方法の工夫があることが判明した。これを極力再現することにより、同等の治療成績を多施設で再現できるかについて検討し、同時に普及させて均てん化を図ることが本臨床試験の目的である。造血幹細胞移植の前方視的多施設臨床試験は施設による移植経験に差が大きく一般的には難しいが、移植治療の普及とともに少しずつ登録症例が増えていて、登録期間の 2 年間の延長ができれば何とか完遂できる見通しが立った。わが国でも臍帯血を用いたいくつかの臨床試験が進行中であるが、移植方法をここまでこだわった臨床試験は今のところなく、本臨床研究による安全性や有効性の結果は重要である。

E. 結論

成人の造血器腫瘍患者を対象に、東大医科研の臍帯血移植法の追試・検証のための臨床試験が進行中であり、進捗状況は遅いもののその重要性から登録期間を 2 年間延長して継続を予定している。現在は試験結果を公表する段階にない。

F. 健康危険情報

これまでに重篤な有害事象として HHV-6 脳炎疑い(1例)と原疾患の再発による死亡(1例)の計2例が報告されたが、前者は臍帯血移植後に起こり得る合併症として一般に認識されていること、後者は臍帯血移植と因果関係がないと判断された(表4)。

G. 研究発表 (別紙)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

図1 臨床試験の概要

【目的】 東京大学医科学研究所附属病院の方法を用いて、同種造血幹細胞移植の適応となる成人造血器悪性腫瘍患者に対する骨髄破壊的・非血縁者間同種臍帯血移植の有効性と安全性を評価する。

【対象】 同種造血幹細胞移植の適応があり、HLA適合または1抗原不適合の血縁者ドナーが存在せず、本研究の適応基準を満たす以下の20～54歳の造血器悪性腫瘍患者

1. 初回寛解期でない de novo 急性骨髄性白血病
2. 急性リンパ性白血病; 第2回目以降の寛解期
3. 予後不良な初回寛解期の急性白血病
4. 慢性骨髄性白血病; 第2回目以降の慢性期、および移行期
5. 骨髄異形成症候群 (RAEB-1、RAEB-2 および 輸血依存性が高いあるいは高リスク染色体異常を有するRA) および 骨髄異形成症候群から移行した急性骨髄性白血病

登録

☆登録後は研究調整医師と連絡を取り、原則として医科研の方法を再現するように努めて移植を施行する。

【臍帯血移植】 移植至適時期に遅滞なく移植

day		-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
TBI	12 Gy	↓	↓	↓						
G-CSF*	5 μg/kg				←	→				
Ara-C	3 g/m ²				↓	↓	↓	↓		
CPA	60 mg/kg							↓	↓	
臍帯血移植										×
シクロスポリン	3 mg/kg 10 時間点滴									
MTX**										

*骨髄系造血器腫瘍に対しては、G-CSF 5 μg/kg/day をシタラビン開始12時間前より持続投与。終了は2日目2回目のシタラビンの投与終了時刻とする。

**MTX 15 mg/m² day 1, 10 mg/m² days 3 & 6 iv (ロイコボリン・レスキューを行う)

移植後100日 プロトコール治療終了
移植後1年 観察終了