

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

小児血縁ドナーの権利擁護と家族の意思決定援助に関する研究

研究分担者 土田 昌宏 茨城県立こども病院 病院長 小児血液腫瘍科

研究協力者 松井 基子 同 Child Life Specialist

研究要旨：我々は血液腫瘍性疾患の患者の同胞に対して、早期から家族の一員として関わられるように、多職種のプロジェクトチームが診断時からの同胞（ドナー候補者）援助プログラムを計画、実行、評価してきた。今回の研究報告は、チャイルドライフスペシャリスト（CLS）の立場からのアプローチの有用性について、CLS からみた同胞と家族援助のあり方と課題について検討した。

A. 研究目的：

チャイルド・ライフはこどもを力ある存在ととらえ、こどもの権利条約にあるように

「人格を持った独立した個人であって権利・自由の主体である」と考えている。しかし、成長発達に対する配慮は不可欠であり、その権利を保障するためには専門的な関わりが必要である。チャイルド・ライフ・プログラムの遂行者であるチャイルド・ライフ・スペシャリスト（以下 CLS）は、子どもの代弁者として子どもの立場から医療者と協力しながら、入院や処置・検査によるストレスを軽減すること、成長発達を促進することを大きな柱に活動している。この CLS の役割を患者の同胞支援にまで拡大することの意義と課題について検討した。

B. 研究方法

CLS の立場から、同胞支援チームプロジェクトに参加することを通じて、子どもの代弁者としての立場から、プロジェクトを評価し、また自ら関与することの有用性と、病院全体に関する、同胞および家族支援に関する課題について考察する。

C. 研究結果：CLS としての関わり

1) 親を通じた支援

きょうだい児への配慮が必要なことになるべく早く気づいてもらう。治療を通して、きょうだい児の様子を聞く。

2) 多職種との連携

説明時の内容や伝える方法を一緒に検討する。

①病気は誰のせいでもないこと

②うつる病気ではないこと

③入院期間や最初の外泊時期の目安

これからの生活の見通しを持てるように得た情報やアセスメントを伝える。

3) きょうだい児との関わり

①病院やスタッフに親しみを持てる環境作り。

②医師の説明に同席。その後、遊びや話を通して理解を促進する。

③きょうだい児も頑張っていることを認め、スタッフも心配していることを伝える。

④入院生活の様子や変化を知ってもらう。

⑤きょうだい児が感じやすいという様々な感情について話す。

⑥処置や検査が必要な場合にはプリパレインを行う。

チームによる関わりの結果

- ①子どもへの情報が一貫した正確なものになる。
- ②保護者が、きょうだい児支援への理解を深めることができる。
- ③保護者がきょうだいのことを医療者に相談してもよいと認識できる。
- ④きょうだい児が自分もチームの一員であると思える。
- ⑤ことの重大性に気がつく。

D. 考察と課題

病院で過ごす子どもたちよりも、取り残されやすい立場にいるのが「きょうだい児」である。兄弟姉妹の入院で、突然生活環境が変わり不安定になるきょうだい児も少なくない。当院においても、きょうだい児の登園拒否や不登校などの不適応事例を経験している（H21年度研究報告）。不適応の背景には様々な要因があるが、兄弟姉妹の入院がきっかけとなっていることもある。

きょうだい児にとっても、理解に応じた説明を受ける権利があり、親や兄弟姉妹と過ごす権利があり、非日常的な出来事に対応するために専門のスタッフからサポートを受ける権利がある。当院では、長期入院の場合できるだけ入院当初にきょうだい児に来院してもらい、スタッフから病気や病院での兄弟姉妹の様子を説明している。

一方でCLSの立場から見ると、きょうだい児が来院しやすい環境についてはまだ検討の余地が残っている。面会時のスペースや待ち時間の「見守り者」の不在は、きょうだい児をつれてくるのをためらわせている。現在ある保育のボランティアをさらに充実させ、ハード面での設備の充実させることが求められている。

小児血液腫瘍疾患患児は長期の入院治療が中心となるため、家族全体を対象とする援助が必要である。

その1つのプロジェクトとして、同胞や家族支援チームにおけるCLSは子どもの代弁者として、また客観的評価者として大きな役割を持つと考えられた。

同胞支援プロジェクトの課題

- ①面会時間制限の緩和。
- ②面会時のスペースや待ち時間の見守り者を配置する。
- ③現在ある保育のボランティアをさらに充実させる。
- ④節目や状況の変化に応じたフォローが不足している。
- ⑤きょうだいに参加できる行事の計画やきょうだい同士が知り合うことの出来る場（ピアサポート）作りが求められる。

F. 健康危険情報

危険性はない。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当しない。

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

成人長期生存症例QOLに関わる因子の抽出とその対策に関する研究 同種造血幹細胞移植後長期生存例における慢性腎臓病 —発生率、有病率、関連因子—

研究分担者 秋山 秀樹 都立駒込病院 血液内科
研究協力者 下井 辰徳 都立駒込病院 血液内科

研究要旨：造血幹細胞移植後10年目での慢性腎臓病の有病率は33%であり、移植後AKIは5年目CKDに有意に関連した。

A. 研究目的

慢性腎臓病（CKD）は同種造血幹細胞移植（HCT）後長期生存者の合併症であるが、その発生率と有病率の推移を長期間経時的に解析した。

B. 研究方法

1990～1999年に当科でHCTを施行され10年以上生存した77例のデータベースを後方視的に解析した。CKDはeGFR $<$ 60ml/min/1.73m²が3カ月以上持続することと定義し、HCT後急性腎傷害（AKI）は、HCT後100日までの血清Cr値の変化に基づいたAKI-Networkの診断基準により3つのstageに分類した。累積CKD発症率をKaplan-Meier法で、「HCT後5年または10年時点でCKDである」ことに対する関連因子を多変量logistic回帰分析により解析した。

（倫理面への配慮）

施設倫理委員会による承認を得、かつ個人情報の管理には十分留意した。

C. 研究結果

対象患者の背景を表1に、移植後の結果を表2に示す。

新規CKD発症率はHCT後1年目が10%で最も高く、以後は毎年約2%で一定であった（図1）。したがって、CKD有病率は観察年数に伴い漸増した（移植5

年目22%、10年目33%）（図2）。5年目CKDの関連因子は前処置放射線照射（TBI/TLI）（OR, 12）、AKI（OR, 11）、移植時年齢（OR, 1.1）（表3）、10年目CKDのそれは移植時年齢（OR, 1.1）、TBI/TLI（OR, 22）、慢性GVHD（OR, 5.4）（表4）であった。

D. 考察

10年目CKD有病率（33%）は欧米の既報（4.5-10%）に比べ高かったが、後者は継時的な解析による結果ではない。移植後AKIは5年目CKDの関連因子であるが、10年目CKDの因子ではなかったことは、AKIのCKDに対する影響は移植後早期に強く関わるが、長期の経過で減弱していくことを示唆する。

E. 結論

HCT後CKDの有病率は経年的に増加し5年目で22%、10年目で33%である。移植後AKIは5年目CKDのみに有意に関連するが、移植時年齢とTBI/TLIは両CKDに共通した関連因子である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

H. 知的財産権の出願、登録状況

特になし。

表1. 10年以上生存患者の患者背景

	CKD なし n = 51	CKD あり n = 26	P 値
男性	31 (61%)	13 (50%)	0.47
幹細胞移植時年齢; 中央値(範囲)	28 (17-49)	39 (21-57)	0.0011 *
疾患のリスク (ハイリスク症例) ††	6 (12%)	6 (23%)	0.21
非血縁ドナーからの移植	11 (22%)	8 (31%)	0.27
ドナーのHLA 1 ミスマッチ移植 (DR または A)	4 (7.8%)	3 (11%)	1.00
前処置における放射線照射	19 (37%)	15 (58%)	0.033 *
原病			
CML / AML / ALL	23 / 9 / 6	11 / 6 / 6	
MDS / SAA / NHL / MF	6 / 4 / 2 / 0	0 / 2 / 1 / 1	

表2. 移植後の結果

	CKD なし n = 51	CKD あり n = 26	P 値
急性 GVHD grade 2以上	14 (27%)	9 (35%)	0.60
慢性 GVHD	17 (33%)	16 (61%)	0.015 *
移植後新規の問題点			
CKD発症前の高血圧	2 (3.9%)	2 (7.7%)	0.60
CKD発症前の脂質異常症	4 (7.8%)	2 (7.6%)	1.00
CKD発症前の糖尿病	3 (5.9%)	3 (12%)	0.40
移植後100日までのAKI発症			
Stage 0 (AKIなし)	17	0	
Stage 1	13	12	
Stage 2	15	8	
Stage 3	6	6	

図1. 1年ごとのCKD発症率

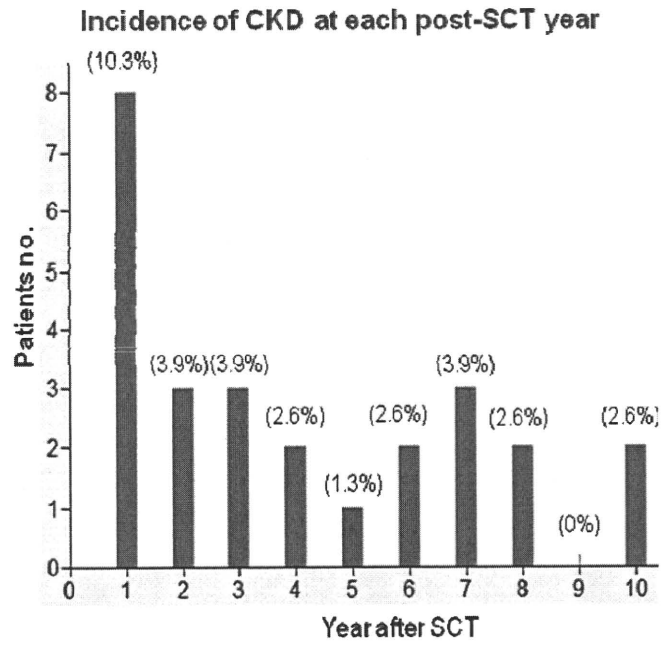


図2. CKDの累積有病率

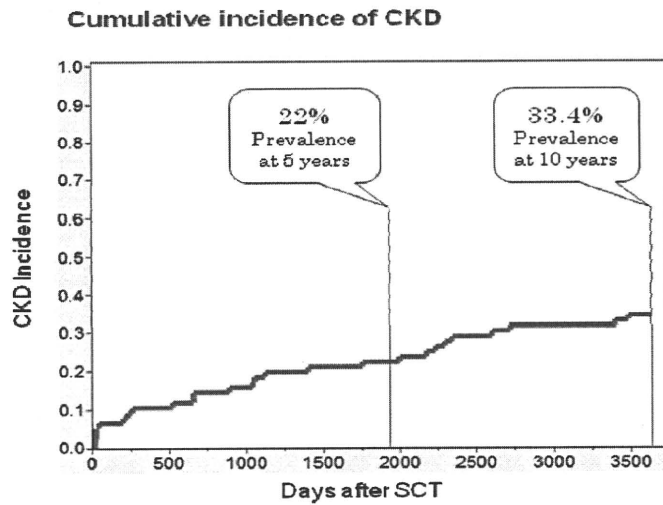


表3. 5年目時点のLogistic 解析

因子	オッズ比	95% CI	p 値
AKI stage 2, 3	10.89	4.78 ~ 14.62	0.023 *
放射線照射の前処	12.51	-4.69 ~ -0.74	0.010 *
移植時年齢	1.12	-0.21 ~ -0.035	0.0091 *
慢性 GVHD	3.13	-2.75 ~ 0.33	0.14
原病のリスク	2.86	-2.90 ~ 0.80	0.25
性別(男性)	1.01	-1.51 ~ 1.46	0.99
急性 GVHD	1.09	-1.50 ~ 1.79	0.92
非血縁ドナー	1.08	-2.06 ~ 1.99	0.94
HLA (1ミスマツ	1.64	-2.82 ~ 2.00	0.67

表4. 10年目時点のLogistic解析

因子	オッズ比	95% CI	p 値
AKI stage2, 3	2.17	-2.29 ~ 0.58	0.26
放射線照射の前処置	21.90	-5.19 ~ -1.40	0.00012*
移植時年齢	272.70	-0.22 ~ -0.063	<0.0001 *
慢性 GVHD	5.42	-3.21 ~ -0.33	0.014 *
原病のリスク	2.68	-2.67 ~ 0.61	0.23
性別(男性)	2.12	-0.54 ~ 2.13	0.26
急性 GVHD Grade2-4	3.77	-0.16 ~ 3.07	0.081
非血縁ドナー	2.29	-0.76 ~ 2.58	0.31
HLA (1ミスマッチ)	3.94	-0.93 ~ 4.21	0.26

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

血栓性微小血管障害の診断と治療の確立に関する研究 —消化管TMAの病態解析ならびに診断、治療に関する後方視的研究—

研究分担者 原 雅道 愛媛県立中央病院がん治療センター 副院長・センター長

研究要旨：血栓性微小血管障害（TMA）の診断と治療の確立のため、これまでに明らかにされていなかった消化管TMAの病態を解析する。対象は造血幹細胞移植後TMA、急性GVHDⅡ度以上と診断した症例および移植後、腹痛、下痢、消化管出血を呈した症例で、下部消化管内視鏡検査にて組織生検を行った症例とする。臨床、検査、病理各所見から総合的に検討して病態の層別化を図る。その結果得られた種々の因子から消化管TMAの病態を明らかにする。さらに消化器病変を呈する移植症例の病態別ステロイドの使用方法等、治療方針を確立する。

A. 研究目的

造血幹細胞移植に伴う血栓性微小血管障害（TMA）は最小動脈の血管内皮障害を主体とし、急性GVHD、感染症、前処置などに伴う治療関連毒性などが複雑に絡み合って発症する移植後合併症であり、治療に苦慮することが多い。近年TMAの病型のうち下痢などの腹部症状を呈する消化管TMAの存在が注目されているが、消化管GVHDとの鑑別が難しく、診断基準も確立されていない。本研究は消化管TMAの病態を臨床病理学的に解明することを目的とする。

B. 研究方法

研究協力者の所属する各施設にて2002年1月から2007年12月までの6年間に同種造血幹細胞移植を施行した患者で、移植後TMA、急性GVHDⅡ度以上と診断した症例および移植後、腹痛、下痢、消化管出血を呈した症例で、下部消化管内視鏡検査にて組織生検を行った症例を対象とする。

可能な症例では生検材料を用いて新たにHE染色、免疫染色標本作製し、3名の病理医師のもとで中央診断を行う。組織標本からGVHD、TMA、CMV感染症診断にそれぞれ使われている病理学的項目を検討し、診断、治療に寄与する病理組織学的項目を抽出する。

一方臨床データも同時に集積して、臨床所見、検査所見、病理所見から総合的に検討し、病態の層別化を図る。その結果得られた種々の因子から消化管TMAの病態を明らかにする。さらに消化器病変を呈する移植症例の病態別ステロイドの使用方法等、治療方針を確立する。

本研究は疫学研究に関する倫理指針（平成19年文科省、厚労省告示）に則って行う。参加各施設の倫理委員会審査を行い、研究対象者には同意を得ることを原則とするが、同意が得られない場合には、研究の意義、目的、方法、研究機関名等について情報公開を行う。また検体、資料は厳格に匿名化を行い厳重に管理する。

C. 研究結果

2011年1月現在、登録された症例は145例で、登録症例の病理組織標本作製は完了した。

臨床事項登録145例の解析では血縁者間移植49例、非血縁者間移植96例、移植方法別では骨髄移植82例、末梢血幹細胞移植37例、臍帯血移植26例、前処置別では骨髄破壊的前処置施行例92例、骨髄非破壊的前処置施行例53例、GVHD予防はCsA+MTX 61例、CsA単独 9例、FK+MTX 64例、FK単独 11例、生検日は移植後12～203日であった。

D. 考察

TMA、GVHD症例あるいはCMV感染症症例が混在しているが、登録症例は骨髄移植例、非血縁者間移植例、骨髄破壊的前処置症例が多い傾向が見られた。

消化管TMAの病態を臨床病理学的に検討した研究はこれまで報告がなく、本研究の結果が期待される。

E. 結論

研究継続中で未

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働省科学研究費補助金（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

同種造血幹細胞移植における患者家族の心理状態、Quality of Life、介護負担感に関する調査

研究分担者 岡本真一郎 慶應義塾大学医学部血液内科 教授
竹内 麻理 慶應義塾大学医学部精神神経科 助教

研究要旨：がん患者には高頻度に不安やうつ状態が見られるが、がん患者の家族も介護者であると同時に、患者同様ケアが必要な心理状態にあることが多いと言われている。造血器腫瘍に対する同種造血幹細胞移植では、治療による臓器傷害、GVHD や感染症等の合併症に対するケアが不可欠であり、長期的経過や家族背景を視野に入れた治療体制が重要である。そこで家族が抱える問題を調査し、必要な支援内容を探ることを目的に調査を行った。本研究では慶應義塾大学病院で2003年～2009年に同種造血幹細胞移植を受けた患者の家族のうち、同意が得られた66名に対して2010年8月～10月に質問紙を用いてProfiles of Mood States (POMS)、MOS Short-Form 36-Item Health Survey (SF-36)、Caregiver Reaction Assessment (CRA-J) を施行した。患者内訳は男性29人、女性37人、移植時の平均年齢は43.5歳、移植から調査までの平均期間は49.9ヶ月、移植後再発は5人であった。家族内訳は男性35人、女性29人、不明2人、平均年齢54.5歳で、患者との関係は配偶者47人、両親14人、その他5人であった。心理状態をみるPOMSでいずれの項目でも標準値以下とならなかったのは17人(25.8%)のみだった。SF-36の各尺度別でみると、日常役割機能(身体)、日常役割機能(精神)、社会生活機能の順で国民平均に比べQOLが低下していた。CRA-Jの結果では介護負担を感じている家族は少数だったが、負担感の強い家族ではPOMSやSF-36で標準値以下の項目が多い傾向があった。移植から数年経過しても問題を抱える家族は少なくなかった。全体的に介護力の大きいケースが多かったが、それにも関わらず問題を抱えた家族が多いことより、各職種が連携して家族に対する支援体制を構築する必要があると考えた。今後、さらに解析をすすめ、家族の心理状態やQOL、介護負担感に与える因子について、患者背景と家族背景と合わせて検討していく予定である。

A. 研究目的

がん患者には高頻度に不安やうつ状態が見られるが、がん患者の家族も介護者であると同時に、患者同様ケアが必要な心理状態にあることが多いと言われている。特に、造血器腫瘍に対する同種造血幹細胞移植においては、大量化学療法や放射線照射による臓器傷害、その後発症する移植片対宿主病(GVHD)や感染症など合併症に対するケアが不可欠であり、長期的経過や家族背景を視野に入れた治療体制が極めて重要である。そこで、患者の家族が抱える心理的問題・介護負担感・生活の質を調査し、支援の構築、ニーズを探ることを目的として本研究を計画した。

B. 研究方法

慶應義塾大学病院で同種造血幹細胞移植を受けた患者家族のうち、文書で同意が得られた家族に対し、質問票を用いて、心理的問題・介護負担感・生活の質の各側面から評価を行った。心理状態は日本語版Profiles of Mood States (POMS)、生活の質はMOS Short-Form 36-Item Health Survey (SF-36)、介護負担感についてはCaregiver Reaction Assessment (CRA-J)によって評価した。患者の年齢、疾患名などの基礎データは、研究分担者が診療録より情報を得た。本研究は慶應義塾大学医学部倫理委員会承認を得て実施した。

<対象>

2003年1月～2009年12月に同種造血幹細胞移植を受けた患者が、介護者としてキーパーソンとして挙げた家族のうち、以下の適格条件および除外基準を満たすものを対象とした。

適格条件

- ①2003年1月～2009年12月に慶應義塾大学病院において造血幹細胞移植を行った患者の家族
- ②患者がkey personとして挙げた家族
- ③年齢20歳以上
- ④文書による同意が得られた者

除外基準

- ①日本語の書字、読字、会話が不可能な者
- ②移植後にいかなる原因であれ死亡した患者の家族
- ③主治医が不相当と判断した患者の家族

C. 研究結果

患者背景

対象期間に慶應義塾大学病院で同種造血幹細胞移植を施行された患者は158人であった。そのうち選定基準に基づき対象となった患者は98人であった。住所不明の11人、患者あるいは家族から同意が得られなかった21人が脱落したため、調査は66人(男性29人、女性37人)に行った。移植時の平均年齢は43.5歳、移植から調査までの平均期間は49.9ヶ月であった。疾患内訳は急性骨髄性白血病15人、急性リンパ性白血病9人、慢性骨髄性白血病1人、慢性リンパ性白血病1人、骨髄異形成症候群14人、多発性骨髄腫7人、悪性リンパ腫12人、骨髄線維症4人、再生不良性貧血1人、成人T細胞白血病1人、顆粒球性肉腫1人だった。調査期間までに再発を認めた者は5人であった。

家族背景

回答を得られた家族は、男性35人、女性29人、不明2人で、平均年齢は54.5歳であった。

患者との関係は配偶者47人(夫30人、妻17人)、

両親14人(父親5人、母親9人)、子供2人、姉1人、不明2人であった。職業は、フルタイム27人、パートタイム8人、専業主婦15人、無職9人、学生2人、その他5人だった。

POMSの結果

POMSの各尺度について、基準となる一般人口の標準値と比較すると、標準値以下(平均値-1標準偏差以下)はそれぞれ緊張-不安:6人(9.1%)、抑うつ-落込み:9人(13.6%)、怒り-敵意:8人(12.1%)、活気:11人(16.7%)、疲労:13人(19.7%)、混乱:10人(15.1%)であった。いずれの尺度でも標準値以下とならなかったのは17人(25.8%)のみで、残りの49人(74.2%)は少なくとも一項目以上について標準値以下を示していた。

SF-36の結果

SF-36の各尺度について標準値と比較すると、標準値以下の者は身体機能:6人(9.1%)、日常役割機能(身体):14人(21.2%)、体の痛み:6人(9.1%)、全体的健康感:3人(4.5%)、活力:7人(10.6%)、社会生活機能:10人(15.1%)、日常役割機能(精神):12人(18.2%)、心の健康:9人(13.6%)であった。いずれの尺度でも標準値以下とならなかった者は39人(59.1%)だった。

CRA-Jの結果

CRA-Jについては標準値が存在しないため、3点をカットオフ値として解析した。カットオフ値以下は、日常生活への影響:10人(15.1%)、他の家族からのサポート:2人(3.0%)、経済的な影響:5人(7.6%)、健康状態への影響:10人(15.1%)、ケアに対する受け止め:14人(21.2%)であった。

D. 考察

POMSの結果より、造血幹細胞移植患者の家族ではなんらかの心理的な問題を抱えている割合が高いことがわかった。また、心理的問題を抱えている家族の割合と、移植からの時間や再発の有無とは相関は見られず、今回の調査からは、再発なく

移植から数年経過しても家族の心理的問題は残存する可能性が示唆された。SF-36の結果からは、心理的問題だけでなく身体機能、社会生活機能が低下している家族も多いことがわかった。一方、CRA-Jの結果からは、当院で移植を受けた患者は、比較的経済的な問題は少なく、家族間のサポート力も大きいケースが多いと考えられたが、それらの問題が少ないにも関わらず心理状態やQOLが低下している家族が多く認められることより、主治医チームと精神科医や心理士、ソーシャルワーカー等の専門職との連携を図り、介護者である家族に対しても必要なサポートを提供していく体制の構築が重要と考えられた。今後、さらに解析をすすめる、家族の心理状態やQOL、介護負担感に与える因子について患者背景と家族背景と合わせて検討していく予定である。

3. その他
該当なし

E. 結論

本研究より、同種造血幹細胞移植において、患者家族の心理的状态、生活の質が一般人口に比べて低下している割合が高いことが示唆された。長期間の闘病生活を支える家族が疲弊することなく患者をサポートできるよう、医療者が患者だけでなく家族にも支援を行っていく必要があると考えた。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

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

移植片対宿主病の診断に関するガイドラインの作成と二次治療も含めた効率的な 予防および治療法の確立に関する研究

研究分担者 豊嶋 崇徳 九州大学病院 遺伝子・細胞療法部 准教授

研究要旨：消化管急性GVHDに対する経口ベクロメタゾン療法の有効性を検討した。14例中9例で完全寛解、1例で部分寛解と高い有効率が示された。とくに胃病変が主体のグレードIIa例での有効率が91%と高率であった。本療法の胃GVHDに対する局所療法として有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

急性GVHDに対する標準的治療はステロイド全身投与であるが、感染症による非再発死亡の増加が問題となる。ベクロメタゾンは、大部分が局所粘膜で代謝される非吸収型ステロイドであり、全身の副作用の少ない治療薬として期待される。

B. 研究方法

福岡BMTグループで、2008年10月から2010年10月までに同種移植を施行され、消化管GVHDに対して、ベクロメタゾンが投与された14例について検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は倫理委員会の承認を得、文書で同意書をえて実施した。

C. 研究結果

14例の内訳は骨髄移植10例、臍帯血移植4例であった。GVHDはグレードIIaが11例、それ以上が3例であった。臍帯血移植では50%に有効、骨髄移植では80%に有効であった。グレードIIaでは91%に有効であった。重篤な有害事象はみられなかった。

D. 考察

少数例での解析であるが上部消化管病変に対し特に有効性が高い傾向を認めた。

また安全に投与が可能であった。大規模な試験での評価を実施する価値があると考えられた。

E. 結論

上部消化管病変に対する経口ベクロメタゾン療法は安全に実施でき、その有用性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Asakura S, et al., Teshima T. : Alloantigen expression on non-hematopoietic cells reduces raft-versus-leukemia effects in mice. *J Clin Invest* 120:2370-2378, 2010.
- 2) Nagafuji K, Teshima T, et al. : Peripheral blood stem cell versus bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donors in patients with leukemia: a propensity score-based comparison from the Japan Society for Hematopoietic Stem Cell Transplantation registry. *Int J Hematol* 91: 855-864, 2010.
- 3) Oh I, Teshima T, et al. : Altered effector CD4+ T cell function in IL-21R^{-/-} CD4+ T

- cell-mediated graft-versus-host disease. *J Immunol* 185: 1441-1444, 2010.
- 4) Kamimura T, Teshima T, et al.: Role of autotransplantation in the treatment of acute promyelocytic leukemia patients in remission: fukuoka BMT group observations and a literature review. *Bone Marrow Transplant* 2010, online.
- 5) Mori Y, et al., Teshima T: High incidence of false-positive *Aspergillus galactomannan* test in multiple myeloma. *Am J Hematol* 85: 449-451, 2010.
- 6) Aoyama K, Matsuoka K, Teshima T: Breast milk and transplantation tolerance. *Chimerism* 1: 19-20, 2010.
- 7) Numata A, Teshima T, et al.: Long-term outcomes of autologous PBSCT for peripheral T-cell lymphoma: retrospective analysis of the experience of the Fukuoka BMT group. *Bone Marrow Transplant* 45: 311-316, 2010.
- 8) 豊嶋崇徳, 他: 造血細胞移植ガイドライン「同種末梢血幹細胞移植のための健常人ドナーからの末梢血幹細胞動員・採取に関するガイドライン」. 日本造血細胞移植学会. 2010
- 9) Teshima T, et al.: Rituximab for the treatment of corticosteroid-refractory chronic graft-versus-host disease. *Int J Hematol* 90: 253-260, 2010.
- 学会秋季シンポジウム. 2010年9月22日. 福岡.
- 4) 豊嶋崇徳: 臓器・細胞移植と輸血の現状. 第34回日本血液事業学会総会. 2010年9月21-23日. 福岡.
- 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
2. 学会発表
- 1) 豊嶋崇徳: 造血細胞移植におけるドナーT細胞機能動態の新たな知見から GVHD/GVL を考える. 第32回日本造血細胞移植学会総会. 2010年2月19日-20日. 浜松.
- 2) 豊嶋崇徳: 非血縁者間末梢血幹細胞移植の開始にむけて. 第110回日本血液学会東北地方会. 2010年9月4日. 山形.
- 3) 豊嶋崇徳: 非血縁者間同種末梢血幹細胞移植の実施に向けて. 第17回日本輸血・細胞治療

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

新しいAML腫瘍マーカーの開発に関する研究

研究分担者 浜口 功 国立感染症研究所血液・安全性研究部 部長
研究協力者 倉光 球 国立感染症研究所血液・安全性研究部 研究員

研究要旨：これまで我々はHE4が造血幹細胞や生殖幹細胞などで高発現し、血液腫瘍であるAMLにおいても比較的未分化性の高いM0-M2で高値を示すことを見いだした。本年度は症例数を増やし、AML患者血漿7例でHE4値を測定した。その結果、健常人の末梢血由来の血漿に比べ、AMLでHE4値が高いことが明かとなった。このことからAML患者血漿でのHE4の測定は、AMLの血清マーカーとなる可能性が期待できると考えられた。今後は検体数を増やし、AMLで血清HE4の上昇がAMLの診断に応用できるか検討する必要がある。

A. 研究目的

これまでに我々は、造血幹細胞や生殖幹細胞などに高発現するmRNAのTranscriptome解析の中からHE4 (WFDC2) mRNAが骨髄AML患者細胞で高発現することを見出した（未発表）。急性骨髄性白血病（AML）は、年間7000人以上の死者を出し特に高齢者に多く発症する極めて重篤な疾患である。AMLは、発見後速やかに治療を開始することが重要であり、早期発見のための診断マーカーの開発が強く期待される。AML患者の骨髄細胞でHE4の定量PCRを行った結果、正常骨髄細胞よりも極めて高い発現が認められた。HE4は、分泌型のセリンプロテアーゼの仲間であることが2次構造より機能予測されている。また卵巣癌細胞で高発現することが知られ、近年CA125に並ぶ優れた卵巣ガンの血清マーカーとして注目されている因子である。また卵巣ガン以外にも外陰部ガンや乳がん等のマーカーとなる可能性も指摘されている。HE4がAML細胞で高発現するという報告はこれまでにない。HE4は骨髄AML細胞に特異的に発現し、分泌型のタンパク質因子であることからAMLの早期診断マーカーとして理想的であると考えられる。

そこで、本研究ではHE4がAML患者の血清で優位な上昇として検出できるか検討し、HE4を用いて血

清レベルでAMLの検出方法が確立できるか検討する。

B. 研究方法

・血清・血漿の準備

AML患者血漿は、ALLCELL社より購入した。

・HE4 EIA Asssay_

HE4の測定は、HE4 EIA kit（富士レビオ）を用い、添付の説明書に従って行った。検出は、iMark microplate reader（BioRad）で620nmの吸光度を測定した。キットに添付の標準品で検量線を作成し、それぞれの血清・血漿のHE4濃度を算出した。

（倫理面への配慮）

AML患者血漿（末梢血由来）については、ALLCELL社で市販されているものを使用した。

C. 研究結果

AML患者末梢血中のHE4タンパク質発現量の検討

AML患者（N=7）血清中のHE4タンパク質レベルを富士レビオHE4 EIAキットを用いて測定した。その結果、健常人の血漿（N=5）のHE4値は、22-82pM（平均値40pM）であったのに対しAML患者（N=7）では46-255pM（平均値132pM）と高値であることが明ら

かになった (Figure 1)。

D. 考察

AML患者(N=7)の血漿中のHE4タンパク質レベルは、健常人の値より高値であることが明らかになった。近年、血清HE4値は、卵巣がんの優れたマーカーとしても海外で認められつつある。卵巣がん患者血清で約95%確定となるHE値は、150pM以上とされる。我々が測定したAML患者血漿の7検体のうち2検体は150pM以上を示し、AML患者の血漿においても卵巣がんので定められた域値を超えるものもあることが明らかになった。しかしながら、5検体は、150pM以下を示し、AMLにおける域値の設定とその条件下でのAMLの確定率を算出し評価することがAMLでHE4を測定することの有用性を示す上で非常に重要な課題であると考えられた。

E. 結論

これまで、AMLの検査はAMLの原因である変異遺伝子の定量PCRやWT1mRNAの定量など、核酸による検査が主流で行われてきた。これは、AMLに特異的な血清タンパク質がこれまで不明であったことにも起因すると考えられる。今回の我々の結果は、卵巣がんマーカーとしても知られる分泌タンパク質であるHE4が、AML患者の血清でも上昇している可能性を示したものであり、AMLの診断や治療経過の観察への応用が期待できると考えられる。

現在、国立国際医療研究センター血液内科との共同研究にて、双方の施設の倫理審査会の承認を得て、AMLの臨床検体の収集を開始したところである。今後は検体数を増加し、HE4値の域値の設定の違いでのAMLの確定率の算出やFAB型でのHE4値の違い、また治療ステージによる変化、などAMLの診断や経過観察にどの程度応用できるか検討する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

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。

AML患者血漿中のHE4レベル

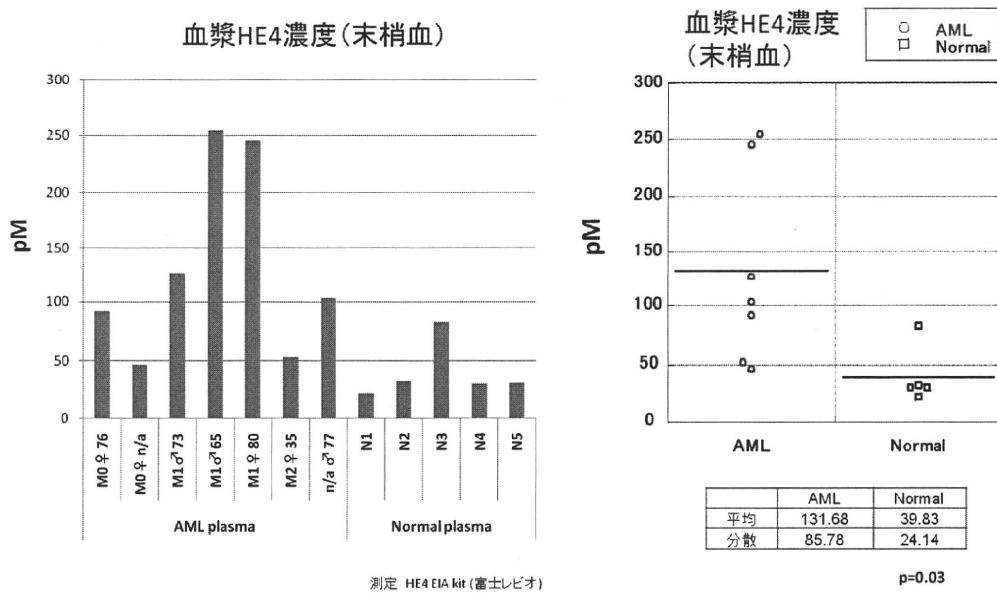


Figure 1 AML患者血清におけるHE4値の測定

AML患者血漿(N=3)および健常人血漿(N=8)でのHE4タンパク質量をHE4 EIAキットを用いて測定した。AML患者血漿では、健常人と比較してHE4値が高い傾向にあった。

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

造血細胞移植後の微生物モニタリング：高感度多項目迅速低価格微生物検出システムの開発と臨床研究

研究分担者 森尾 友宏 東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野

研究協力者 清水 則夫 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・ウイルス治療学

研究要旨：造血細胞移植後における日和見感染症の早期検出と治療に向けて、高感度かつ汎用性のある微生物検出システムの開発を行った。本年度は、16S, 18S rRNA測定→遺伝子塩基配列決定による細菌及び真菌の同定系、マイコプラズマ属を網羅するPCR系の実稼働を開始した。また96 well (12x8 well format)による半定量的PCR系の汎用化に向けた検証を行い、検出試薬作成は企業に、微生物検査については外注会社に技術移転した。

A. 研究目的

開発を進めてきた微生物測定法に改良を加えることが目的である。具体的には、より臨床現場で汎用可能なものとし、また必要な微生物群を充実させることを第一の目的とした。また、そのために作成したシステムにつき、耐用性や再現性などについて、基礎検討を行い、外部委託できる体制とすることをもう1つの目的とした。

B. 研究方法

- 1) 凍結保存型と室温保存型のプレートシステムの開発とその耐用性検証を行った。
- 2) 室温保存型プレートに改良を加え、保存安定性を検証した。
- 3) 外部委託に向けた標準作業手順書を作成した。

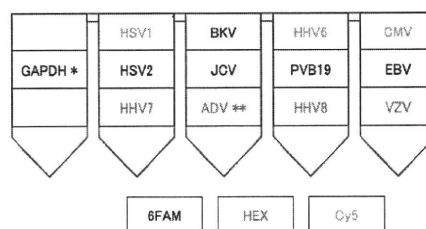
（倫理面への配慮）

本研究では、実際に患者検体を用いて微生物検査を行うため、本学医学部倫理審査委員会の承認を経て研究が行われた。研究に際しては、各種指針を遵守して、十分な説明と同意のもとに、最小限の検体量で解析が行えるように配慮をおこなった。

C. 研究結果

1 及び 2) HSV1, HSV2, EBV, VZV, CMV, HHV6, HHV7, Parvovirus B19, BKV, JCV, ADV の 12 種類のウイルスについて 96 ウェル (12 X 8) 対応のマルチプレックス PCR ready 試薬分注済みプレートを開発した (図 1 参照)。さらに陽性ウェルに対しては、個別の PCR (半定量) を行えるようなプレートを用意した (図 2)。本試薬は凍結タイプであり、融解解凍実験において、その耐用性を実証した。本方式の安定性は高いが、 -80°C 保存という問題点があり、以前作成した室温にて保存可能な固相化 PCR ready プレートを改良して、耐用性試験を実施した。その結果、室温にて最低 3 ヶ月は安定であることが明らかになった。

12種類の測定項目の配置



* GAPDH: Positive Control

** ADV : type 1,2,3,5,6,7,8,10,11,12,16,17,19,21,28,31,34,40,48 を検出可能

図 1 12 種類のウイルス (3 種類 x 4) 及び内部コントロール用ウェルの配置

陽性項目の確認と相対定量

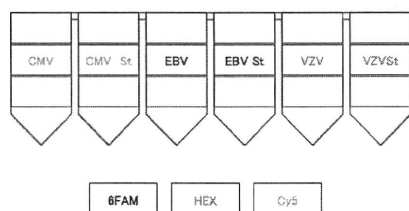


図2 図1の測定系で陽性であった検体の二次検査（ウイルスの確定と半定量検査）

3) 標準作業手順書 (SOP) の作成と技術移転

上記のリアルタイム PCR 系は、詳細な手順について SOP を作成した。また同システムは、日本国内の 5 施設に技術移転した。実際には東京医科歯科大学にて技術指導を行い、企業に技術移転し作成委託した試薬を用いて、自施設のリアルタイム PCR 機を用いて測定を行ってもらった。また自施設に PCR 機を有していない顧客について対応可能なように、ウイルス測定についても検査委託可能なように、XXX に検査システムの技術移転を行った。

D. 考察

以前より開発を行ってきた 12 種類のウイルス測定系については、30 種類以上のウイルスについてラインアップされており、また以前に報告したように細菌共通、真菌共通 PCR 系やマイコプラズマ検出系も開発している。今回提示したリアルタイム PCR 系は、キャピラリー式からプレート式に移行し、また最終的に凍結型から室温型に変更したことにより、より多くのユーザーがアクセスできるシステムが完成したものと考えている。また、SOP の作成や、医療施設や検査会社への技術移転により、さらに汎用されるようになることが期待される。

E. 結論

固相型・室温保存・プレート式の多項目迅速高感度リアルタイム PCR システムを完成し、SOP の構築や、医療機関・検査会社への技術移転、企業

による試薬作成・販売から、造血細胞移植後に汎用可能な検査系が構築できた。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shin MJ, Shim JH, Lee JY, Chae WJ, Lee HK, Morio T, Park JH, Chang EJ, Lee SK. Qualitative and quantitative differences in the intensity of Fas-mediated intracellular signals determine life and death in T cells. *Int J. Hematol.* 92:262-70, 2010.
- 2) Seki M, Kimura H, Mori A, Shimada A, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Agematsu K, Morio T, Yachie A, Kato M. Prominent eosinophilia but less eosinophil activation in a patient with Omenn syndrome. *Pediatr. Int.* 52:e196-9, 2010
- 3) Miyana M, Sugita S, Shimizu N, Morio T, Miyata K, Mochizuki M. A significant association of viral loads with corneal endothelial cell damage in cytomegalovirus anterior uveitis. *Br J Ophthalmol.* 94: 334-340, 2010.
- 4) Hasegawa D, Kaji M, Takeda H, Kawasaki K, Takahashi H, Ochiai H, Morio T, Omori Y, Yokozaki H, Kosaka Y. Fatal degeneration of specialized cardiac muscle associated with chronic active Epstein-Barr virus infection. *Pediatr Int.* 51:846-848. 2009.

2. 学会発表

- 1) 清水則夫、渡邊 健、森尾友宏、吉江弘正、中田 光:再生医療をサポートする網羅的微生物汚染検出システムの開発と応用、第10回日本再生医療学会、2011年3月2日、東京
- 2) 森尾友宏:細胞移植・細胞治療に関する国・学会の指針と基盤整備、第33回日本造血細胞移

植学会総会、2011年3月9日、愛媛

- 3) 清水則夫、森尾友宏:造血細胞移植後感染症の網羅的検査法の実用化に関する取り組み、平成22年度厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有およびドナーとレシピエントのQOLを視野に入れた成績の向上に関する研究」班第2回班会議(谷口班)、2011年1月30日、東京
- 4) 森尾友宏:造血細胞移植後のウイルスモニタリングと感染制御、第11回血液細胞療法フォーラム、2010年10月16日、大阪
- 5) 清水則夫、渡邊健、森尾友宏:造血細胞移植後感染症の網羅的検査法の実用化に関する取り組み、平成22年度厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有およびドナーとレシピエントのQOLを視野に入れた成績の向上に関する研究」班第1回班会議(谷口班)、2010年7月4日、愛知
- 6) 森尾友宏:移植医療におけるウイルス感染症対策:迅速検出法と治療戦略の現状と展望、第35回群馬移植研究会、2010年5月26日、群馬

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

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

白血病関連抗原を標的とした移植片対白血病効果増強の試み

研究分担者 中尾 眞二 金沢大学大学院 細胞移植学

研究要旨：同種造血幹細胞移植（allo-SCT）後にドナー由来の白血病関連抗原（leukemia-associated antigens; LAAs）特異的な細胞傷害性T細胞（cytotoxic T lymphocyte: CTL）を誘導し、十分な移植片対白血病（graft versus leukemia: GvL）効果を期待するためには、白血病細胞がドナーの免疫監視機構からエスケープする機序を打破しなければならない。これまで我々は、①骨髄性白血病細胞および白血病細胞由来樹状細胞（leukemic dendritic cell: LDC）が、抑制性補助刺激分子の一つである GITR（Glucocorticoid-induced TNFR-related protein）のリガンド（GITRL）を発現していること、②LDC上のGITRLがドナーのナイーブCD8⁺T細胞上のGITRと結合することによって、ナイーブCD8⁺T細胞からLAAs特異的CTLの誘導が抑制されること、③白血病細胞由来の可溶性GITRL（sGITRL）がLAAs特異的CTLの活性を抑制すること、④GITR/GITRL結合によって白血病細胞内でインドールアミン酸素添加酵素（indoleamine 2,3-dioxygenase: IDO）活性が高まり、その結果白血病細胞でトリプトファン（trp）が代謝され、細胞外に分泌されるキヌレニン（kyn）によってLAAs特異的CTLの活性が抑制されることを明らかにしてきた。今回我々は、LAAs特異的CTLとGITRL⁺骨髄性白血病細胞を共培養する際に抗GITR抗体、あるいはIDO阻害を添加することによって、GITRL⁺骨髄性白血病細胞に対するLAAs特異的CTLの細胞増殖活性と細胞傷害性が増強することを明らかにした。これらの結果から、移植後LAAsペプチドをワクチンする際に抗GITR抗体、あるいはIDO阻害剤を同時に投与することによって、LAAsを標的としたGvL効果を効果的に誘導できることが示唆された。

A. 研究目的

Cyclin-dependent kinase (CDK)2 蛋白由来 HLA-A24 拘束性ペプチド (CDK2₁₅₈) は、白血病細胞が過剰発現している自己抗原の中から我々が同定した LAAs である。Allo-SCT 後に IDO 阻害剤、抗 GITRL 抗体を投与することによって、GITRL による白血病細胞のドナー免疫監視機構からのエスケープ機序を破綻させ、ドナー由来 T 細胞による CDK2₁₅₈ を標的とした GvL を効果的に誘導しうるか否か検討した。

B. 研究方法

CDK2₁₅₈ 特異的 CTL の誘導

CDK2₁₅₈ をパルスした HLA-A2402 遺伝子導入 T2 細胞 (CDK2₁₅₈A24-T2) を抗原提示細胞として、

HLA-A24 陽性健常者の末梢血ナイーブ CD8⁺T 細胞を繰り返し刺激し、培養した。培養 T 細胞中の CDK2₁₅₈ 特異的 CTL (CDK2₁₅₈-CTL) を、フローサイトメトリーを用いた peptide/HLA pentamer assay で検出した。

CDK2⁺GITRL⁺ 骨髄性白血病細胞に対する CDK2-CTL の細胞増殖活性

CDK2₁₅₈A24-T2 で刺激した培養 T 細胞と CDK2⁺GITRL⁺骨髄性白血病細胞を 5 日間共培養し、T 細胞中の CDK2₁₅₈-CTL の増殖活性を pentamer を用いた CFSE アッセイで検討した。抗 GITR 抗体添加による CDK2₁₅₈-CTL 上の GITR と白血病細胞上の GITRL との結合阻害が CDK2₁₅₈-CTL 増殖活性に与える影響を比較検討し