

特定の目的(すなわち研究のみ、あるいは製造のみ)のためだけに使用することが推奨される。

(2) 生物学的手法およびバイオテクノロジーによって製造された製品

生物学的手法、およびバイオテクノロジーによって製造された研究用 IND (病原性微生物、芽胞形成微生物、遺伝子導入動植物、生ウイルスワクチンと遺伝子治療ベクターから作られる製品を含む)は、特に封じ込めを考慮する必要がある。

製造工程を管理することは、生物学および生物工学的製品の正しい組成と安全性を確保するためにきわめて重要である。したがって、第 I 相臨床試験を開始する際には、同じ特性を有する研究用 IND を再現性よく製造するために、その製造工程と適切な検査方法が文書化され適切に管理されることがきわめて重要である。また、各製造過程で採取され保管されている異なるロットのサンプルを後で比較分析することにより、重要な情報を得ることができるであろう。

安全性に関連する機能(ウイルスの除去、ウイルスや毒素の弱毒化、低温殺菌など)を備えた装置が意図されたとおりに稼働していることを保証するために、適切な品質管理(設備や装置のバリデーション)が行われていることが必要である。ウイルス量、生物負荷量、細菌毒素の解毒、ウイルスの除去もしくは不活化、および抗生物質や化学薬品などの除去のような安全性を目的とした検査を生産時に行い、また感染症病原体に関する適切な試験手順を確立しておく必要がある。

製品の製造が行われる環境を評価する際、それ以前に行われた検査や製造工程の残留物(バクテリア、ウイルス、マイコプラズマなど)を含む感染性病原体による汚染をどの程度受けやすいかを評価することは特に重要である。

① 多品目を製造する施設

多品目を製造する施設は感染性病原体による汚染を予防するためのクリーニング方法の手順と、クリーニング後の評価検査手順を確立しておくことが推奨される。可能な限り専用の設備とディスプレイの物品(チューブ等)を使用することが望ましい。また、多品目を製造するエリアでは、交差汚染を防ぐための手順を確立し、またウイルスやベクターの加工が行われた場合などは、特に共有された設備機器や作業表面から、以前に製造されていた製品の残留物が取り除かれていることを証明することが求められる。

② 遺伝子治療および細胞治療製剤

研究用の遺伝子治療製剤や細胞治療製剤の製造様式は多様かつ特殊であるため、製造者は付加的な管理あるいは特化した管理の妥当性を考慮すべきである。細胞治療研究や遺伝子治療の治験に用いる製品は Phase 1 GMP ガイダンスに従い製造されることが推奨されるが、必ずしもそれらに従うことができない場合も予想される。例えば、ある研究用 IND (細胞)では、入手可能な原材料の量が限られているため、最終細胞製剤の一部をサンプルとして保存が出来ないかもしれ

### 第13章 再生医療分野における海外動向

ない。その様な時には、その製造方法を採用した根拠が研究用 IND (細胞) に関する記録として保管されることが推奨される。

例えば、CGMP ではバリデーションと呼ばれる項目がきわめて重要であるが、その中に製造手順が意図した通りに実施可能か検証する performance qualification (PQ) がある。これに従えば、脾臓移植の場合、ドナーから提供された脾臓組織を用いて練習することが義務づけられるわけであるが、倫理上許されないのは自明である。細胞プロセッシングを実施するうえで、遵守することが難しい CGMP に関するバリデーションの例を表 2 にあげた。

#### ③ 複数ロットの製造

Phase 1 GMP ガイダンスの対象となる生物学的手法あるいはバイオテクノロジーによって製造された製品は、第 I 相臨床試験において一人の被験者につき 1 ロットしか製造できないケースがある (治療用ワクチン、細胞治療、遺伝子治療の場合など)。この場合には、複数ロットの生産によって初めて製造情報や検査情報などが蓄積されるであろう。また、適切な管理手順をもち、それを遵守することによって比較可能な研究用 IND (細胞) の製造が可能になる。一方、同じ研究用 IND で複数ロットを生産する場合には、製造責任者が定期的に製造工程を自己点検し記録を残すことが推奨される。この自己点検は、日常的な製造作業を休止して、製造された研究用 IND の検査成績から得られたデータを含めて、作業手順、工程、および種々の情報を評価することが望ましい。この自己点検結果に基づいて必要な修正や変更を行うことで、作業手順や製

表 2 細胞プロセッシングにおける CGMP バリデーションの問題点

○	DQ	材質、形状、寸法、容量、能力等が設備の使用条件に照らして妥当かどうかを検証する。設備完成後のトラブルを未然に防ぎ、使用目的に合致した設計の導入が目的。	
○	IQ	設備が設計通り作製及び設置されているか等の仕様の確認。	
△	Calibration	機器の校正。新規購入時には問題ないが、仕様後の校正には費用が必要。	
△	OQ	設備の稼働状態での仕様の確認 (IQ は静止状態での確認)。新規購入時には問題ないが、仕様後の校正には費用が必要。	
×	PQ	製造手順、製造施設等がワーストケースにおいて、意図したとおり稼働するかどうか検証。TR ではドライランやウォーターランは可能だが、実原料を用いてのワーストケース (たとえば、バイオバーデン) は実施できないことあり。例えば、試験だけの目的で、ドナーの脾臓を用いることはできない。	
×	PV	設備、工程、手順等の適正化が終了後、SOP 通りに 3 ロットの生産を行い、その品質が一定であることを確認すること。TR では、1 ロット、1 ドナーであり実施不可。	
×	△	CV	洗浄によって表面の残留物が適切に除去されていることを保証し、交叉汚染の可能性を極小化させることを目的としている。生物由来の原料の場合、病原体の検出限界もあり、厳密な CV は不可能。

DQ (Design Qualification : 設計の適合性)、IQ (Installation Qualification : 備付け状態の適合性)、OQ (Operation Qualification : 運転状態の適合性)、PQ (Performance Qualification : 稼働性能の適合性)、PV (Process Validation : 実生産規模での確認)、CV (Cleaning Validation)

造作業を管理することが可能となる。

(3) 無菌製品および無菌処理製剤

研究用 IND (細胞) の無菌化には、特別な予防措置を講じることが推奨される。無菌処理の管理には十二分な注意を払うべきであり、以下の要件に関して考慮することが推奨される。

- ・層流式無菌ワークステーション (清浄度 クラス 100) で無菌操作を行う\*8。
- ・適宜、無菌ワークステーション全体を消毒する。
- ・層流式無菌ワークステーションの中の物品が、気流を妨げていないことを確認する。
- ・層流式フードでの作業中には頻繁に手袋を消毒するか、または取り替える。
- ・試験管ラックおよび殺菌された注射器やフィルターの包装などの未殺菌物品の表面は、それらを層流フード内に置く前に消毒する。
- ・適切な条件の下で殺菌の段階を経た後に、薬剤もしくは成分材料の操作を行う。
- ・成分材料や中間材料、最終製品の無菌性を維持するために、すべての手順を文書化し、それを遵守する。
- ・無菌検査は、検査物品が検査自体による干渉を受けないことが明確にされている必要がある。
- ・微生物やエンドトキシンによる汚染防止を目的として設計された成分材料を用いて無菌操作を行い、微生物汚染を防止する。
- ・無菌操作を行う作業者に無菌操作の教育訓練を行う。
- ・滅菌作業に用いられる設備は使用に適したものでなければならない。例えば、定期的に保守点検および校正が行われ、保守管理記録が保管されている。
- ・無菌成分材料やディスポーザブルの装置 (フィルター、バック、容器など) を使用する際には、滅菌保証分析書、または滅菌方法が検証 (バリデート) されていることを示す証明書を作成するか、あるいは保管しておく。
- ・品質管理部門または品質管理者による最終製品の出荷承認の際に、無菌の手順や予防措置に従ったことを示す製造記録が適切に審査されていることを確認する。
- ・最終製品の出荷承認は、無菌検査による条件に適した結果が確認されるまで行わない。しかし、放射性の研究用 IND や研究用 IND (細胞) のように貯蔵寿命の短い製品は、無菌検査の結果が出る前に他のそれに相当する類似の検査の結果 (例えば、バブルポイントフィルター完全性試験による除菌判定、研究用 IND (細胞) のグラム染色または他の迅速な微生物検出検査に

---

\*8 ワークステーションとは、安全キャビネット (米国ではすべて安全キャビネットであり、いわゆるクリーンベンチは細胞プロセッシングでは基本的に用いられていない)、またはバリアアイソレータ・システムなどのことを指す。

における陰性とエンドトキシン判定試験における陰性)に基づいて、出荷承認しなければならない場合もある。無菌テストや他の関連検査の結果が陽性だった場合には、汚染の原因を確定するための調査を行い、原因が同定された場合には、それに続く是正措置がとられることが推奨される。

#### 1.4 わが国の現状

従来、治験は製薬企業などが医療機関などに依頼して実施されてきたが、医師や医療機関が主導で行う臨床研究についても条件を満たせば「治験」として位置づけられることが可能となった(医師主導型の治験)。これにより、臨床試験で用いられる最新の技術を迅速に医薬品や医療機器の承認申請に反映できるようになった。その反面、従来から行われてきた「高度先進医療」は「先進医療」へ置き換わり、国内で未承認の医薬品や既承認の医薬品であっても適応外の使用は「先進医療」の中では使用が認められておらず、それらの医薬品については改めて治験を行わなければならない。例えば、先進医療は既承認の薬物しか用いてはならないとしており、未承認の薬物を使用した「先進的な」治療法は先進医療としては認められないという矛盾を抱えている。

米国における新薬や新規治療法を開発しようとする場合、わが国で言う治験であろうと、臨床試験(TR)であろうと、すべからくINDとしてFDAに登録し、審査を受け承認を得ることが必要である。すなわち、米国ではどんな臨床試験や治験であってもFDAがINDとして把握して指導を行っている。この点「治験」として申請されたもの以外は、いわゆる「院内製剤」として特段把握もされず、また安全性も検証されず、薬事法の守備範囲外であるとして、医師の自主規制に任されているわが国とは大きく事情が異なっている。わが国の薬事法はもともと新薬を承認するために、企業側から提出される資料の収集とその審査および規制を目的とするものであり、TRから育成して開発に繋げることを考慮したものではない。このことが、米国FDAに比べれば驚くほど人員の少ない総合機構(PMDA)のかかえる問題と相まって、新規治療法開発の隘路となっている<sup>9, 10)</sup>。

米国ではTRの段階からINDとして把握され、品質管理に関してFDAの指導を受ける。したがって、TRで有望な結果が得られれば、スムーズにphase 2, phase 3へと移行する。では、わが国の場合はどのようになるであろうか。「院内製剤」を用いた臨床試験では、たとえ良好な結果が得られたとしても、そのままでは総合機構で審査されることはなく、保険収載など到底不可能である。したがって、大学などで品質管理のされない「院内製剤」を用いて行われている臨床試験の成績をもとに、いざ承認申請を目的とした「治験」の段階に入ろうとしても、もう一度最初に戻って、安全性が検証され、品質の確保されたGMPグレードの治験薬を用いて前臨床試験からやり直さなければならない(図3)。

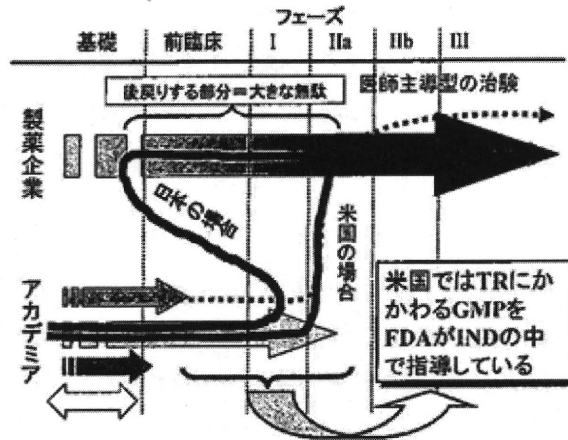


図3 臨床研究と治験システム—日米の比較—

わが国では、上述したようなきわめて複雑なシステムが存在する。この出口のない迷路のような規制体系を整理し、米国のINDシステムのようにシンプルで効率的な体系を構築することが必要である。幸い、わが国には「医師主導型の治験」と言うトラックがあり、これをわが国独自のINDシステムとして育て上げ、このなかにTRのコンセプトを落とし込んで行くことが大切である。

### 1.5 おわりに

米国FDAはTRの積極的な推進と共に、第I相臨床試験での被験者の安全性を守るためにCGMPに準拠したあたらしい規制を作成しようとしている。米国では我が国で言う「治験」や「臨床試験」が、すべてINDとして包括されFDAに登録をして審査を受けるシステムとなっており、どんな治験や臨床試験であってもFDAがその内容を把握し指導を行っており、わが国の「院内製剤」のような特別扱いはありません。わが国においても基礎研究から生み出される最新の治療技術をより早くかつ安全に臨床の現場に提供できるようなシステムを、如何にして薬事法の枠内で構築するかが喫緊の課題である。したがって、米国FDAの提唱するphase 1 GMPガイダンスをわが国の実情を考慮して眺めてみれば、治験薬GMPにできるだけ準拠した製造と品質管理システムをTRのトラックのなかに持ち込む必要があろう。

文 献

- 1) Guidance for Industry. INDs — Approaches to complying with CGMP During Phase I. FDA, CDER, CBER. January 2006 (<http://www.fda.gov/Cder/guidance/6164dft.htm>)
- 2) 江副幸子ほか, 産業界のためのガイダンス, INDs — 第I相試験におけるCGMPに準拠したアプローチ, 臨床評価, 33 (3), 603-624 (2006)
- 3) Summary Progress Report. Pharmaceutical cGMPs for the 21st Century. A Risk-Based Approach. February 2003 (<http://www.fda.gov/cder/gmp/21stcenturysummary.htm>) / Previous Reports, Guidances and Additional Information (<http://www.fda.gov/cder/gmp/index.htm>)
- 4) 「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(厚生労働省)(平成18年9月1日) (<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2006/07/dl/s0727-4l.pdf>)
- 5) Maekawa T., Current good manufacturing practices (cGMP) controlled cell processing for the development of novel advanced cell and gene therapy. Education program book pp. 43-48 (2003). The 65<sup>th</sup> Annual meeting of Japanese Society of Hematology and The 45<sup>th</sup> Annual meeting of Japanese Society of Clinical Hematology.
- 6) 前川平, 先端医療開発に必要なGMP準拠細胞プロセッシング—Institutional GMP構築の必要性—, 臨床血液, 45, 32-38 (2004)
- 7) Maekawa T, Kimura S, Kasai Y., Development of novel advanced cell and gene therapy and GMP-controlled cell processing. *JMAJ*, 48 (2), 1-4 (2005)
- 8) 平成9年5月20日付薬監第73号厚生省薬務局監視指導課長通知「[治験薬の製造管理及び品質管理基準]及び「[治験薬の製造施設の構造設備基準(治験薬GMP)]」の運用について」 ([http://www.hourei.mhlw.go.jp/cgi-bin/t\\_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=3210](http://www.hourei.mhlw.go.jp/cgi-bin/t_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=3210))
- 9) 大串賢一ほか, 再生医療と規制, 再生医療, 5, 16-21 (2005)
- 10) 田中克平, 医薬品医療機器総合機構と再生医療の今後—私案も含めて—, 再生医療, 5, 50-59 (2005)

# 再生医学のいま

— 基礎研究から臨床への展開に向けて —

— 12 —

## 臨床応用に向けて

— その基盤整備の重要性 —

笠井泰成 前川 平\*

京都大学医学部附属病院分子細胞治療センター \*教授

### Summary

再生医療は、人体の失われた機能や組織を再構築するための新しい治療として注目を集めているが、基礎研究の成果をもとに開発された最新の技術を臨床の現場で活かすには「治験」という大きなハードルを超えなければならない。新しい医療技術が開発され、それが一刻も早く臨床で応用されることを願う一方で、再生医療の安全性を確保し高い品質を維持していく管理体制を構築することも肝要である。

### はじめに

再生治療や細胞治療など先進的な医療技術が開発され臨床での応用が可能となれば、既存の方法では治療が難しかった疾病に対しても新たな治療戦略が確立されよう(図1)<sup>1)</sup>。しかし、数多くの基礎研究を経て開発された新しい技術が実際に臨床で応用されるまでには、安全性や治療効果などの評価を得るために「治験」というハードルを超えなければならない。一般的な医薬品の開発では製薬企業が主体となり医療機関に依頼して、いわゆる「治験」が実施されている。また改正薬事法では医師や医療機関が主導で実施する臨床試験についても一定の条件を満たせば治験として扱われることが可能となった。すなわち、「医師主導型治験」と呼ばれるものであり、最新の医療技術を臨床応用するための新しいトラックになると期待される。

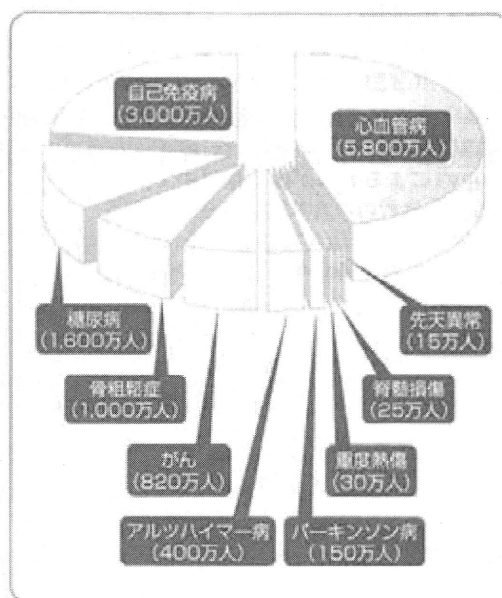


図1 米国において先端医療開発の恩恵にあずかると思われる患者総数の試算 (文献1)より改変)

再生医療で扱われる組織や細胞(以下、再生医療用ヒト細胞)はヒトへ移植されるものであり、医薬品と同様に品質の保証と安全性の確保が必要である。大学病院や研究所などで再生医療用製品の製造(培養や調整など)を行う際には、厳密な品質管理や製造管理が実施できるように専用の施設を設置し、GMP (good manufacturing practice)

に準拠した運用が必要不可欠となる。

わが国における再生医療研究が世界的な開発競争のなかでも勝ち残れるよう、その支援を推進すると同時に、再生医療用ヒト細胞の品質管理および製造管理に関する規制の整備が急務である。

## I 再生治療とGMP

GMPは、医薬品や医療機器などの製造管理および品質管理に関する国際基準である。医薬品では、研究開発段階から生産→流通→使用されるまでの一貫した品質の保証管理体制が要求されている。

再生医療用製品のうち細胞や組織加工製品について治験を開始する際に、まず厚生労働省に対して確認申請を出す。細胞や組織の加工とは、疾患の治療や組織の修復または再建を目的として、細胞・組織の人為的な増殖、細胞・組織の活性化などを目的とした薬剤処理、生物学的特性改変、遺伝子工学的改変、非細胞・組織成分とのハイブリッド化、カプセル化などがこの範疇に含まれる。組織の分離や細切、細胞の分離、抗生物質による処理、洗浄などは加工とみなされない。確認申請の内容が承認されれば、厚生労働大臣へ治験計画を届け出ることができる。医薬品医療機器総合機構(Pharmaceutical and Medical Devices Agency: PMDA)では委託を受け、これを30日以内に審査して結果を大臣に通知する。必要に応じて治験計画の変更を命じられる場合もある。治験はGCPに従って実施され、また治験で使用される再生医療用ヒト細胞

の製造に関しては治験薬GMPに従った管理が必要となる<sup>2)</sup>。しかし、再生医療で用いられる組織や細胞は一般的な医薬品とは異なる特徴をもつため、細胞の特殊性を理解してさまざまな規制を柔軟に適用させる必要がある。

第I相試験は被験者の安全性を保証することが主たる目的となっているため、用いられる臨床研究新薬(治験薬)(investigational new drug: IND)の製造にはCGMP(current GMP)に従った品質管理原則を臨床試験でも適用しなければならない。しかし米国では、大学やベンチャー企業で行われている探索的臨床試験研究(トランスレーショナル・リサーチ: TR)に用いるINDの製造に、市販されている医薬品と同様の規制をかけたのでは開発のスピードが上がらないことが懸念され、FDAが1991年に交付したガイドラインに沿って研究用INDの製造に対して柔軟な指導を行ってきた。さらに2006年1月にはCGMPに従った第I相臨床試験のための生物製剤の製造を支援することを目的とした新しいガイダンス草案がFDAから公表されている<sup>3,4)</sup>。

## II 米国FDAの指針

FDAの新しいガイダンス草案では、第I相臨

床試験に用いられるINDの製造に対する規制は



主として被験者の保護を目的とし、そのうえでヒトでの臨床試験開発の促進を期待している。このガイダンス草案では以下のような提言がなされている。

- ① 臨床開発の段階に応じたINDの品質管理が可能であること。
- ② 多種類のプロジェクトが進められる大学などでの細胞プロセッシングセンターの実情を考慮し、明確な区分ができていれば同一施設で多種類のINDを製造することが容認できること。
- ③ 清掃などの管理を的確に実施することで、異なるプロジェクトを同一の部屋で時間を変えれば可能であること。

④ 治験用ヒト由来細胞の製造に関するバリレーションに柔軟性を持たせたこと、などである。

すなわち、第I相臨床試験においては、数多くのIND候補のなかから安全性を確保しながら適切なINDを効率よく選び出すために、ある程度自由度を持った運用や適切な基準設定が必要であるとしている。このガイダンスの手順に従えば、基礎研究の成果を基にした探索的臨床試験から再生医療を含む医薬品の開発スピードが増し、より有効的で、より安全性の高い医薬品を、より早く患者に提供することが可能になると期待される。

### III 細胞調整に必要な施設

探索的臨床試験や第I相臨床試験においては安全性の確保とともに、効率よく開発を進めることが要求される。探索的臨床試験では大学や研究所など規模の小さな施設において再生治療用ヒト細胞の製造が行われることが多く、ここでは限られたエリアの内で多くの製品や複数ロットが扱われる場合も想定される。したがって、交差汚染の防止や原料や製品の取り間違いを防ぐために原料、資材、製造中間体、そして製品などの保管管理にも十分な配慮が必要となる。これらの要件を満たしながら、医薬品と同

等の品質管理と安全性の確保を高い水準で維持するために必要とされる製造施設の基準は、治験薬GMPで求められている治験薬製造施設の構造設備に関する基準などを参考にして設定する必要がある<sup>3)</sup>。以下にその基準の主な内容を示す。

- 作業所のうち作業室または作業管理区域は、重要区域、直接支援区域、そのほかの支援区域に区分けされており、無菌操作を行うため清浄度レベルが常に維持されている(各区域の清浄度レベルは表1を参照)。
- 無菌室には、専用の前室を付置し、通常当該

表1 作業管理区域の清浄度レベル

名称	清浄度レベル		最大許容微粒子数/m <sup>3</sup>		USP (1116) の規格	主な作業内容
	grade	0.5μm以上				
		非作業時	作業時			
無菌操作重要区域 (層流作業区域)	A	3,530	3,530	クラス 100	開放系調整操作	
無菌操作直接支援区域 (非層流作業区域)	B	3,530	353,000	クラス 10,000	閉鎖系調整操作、 二次更衣	
その他の支援区域	C	353,000	3,530,000	クラス 100,000	組織や細胞の保管、 資材保管、一次更衣	
その他の支援区域	D	3,530,000	※	(対応する規格なし)	モニタリング、 資材などの受け入れ	

※：作業形態により、この区域の許容微粒子数は異なる。

前室を通じてのみ作業室内に出入り(ただし、一方向性が原則)できるような構造のものとし、かつ、その前室の出入口は屋外に直接面していない。

- 作業所のうち作業室または作業管理区域は、製造する無菌製品の種類、剤型および製造工程に応じ、適切な温度、湿度および清浄度を維持できる構造および設備を備えている。
- 温度、湿度、室圧などの環境条件の監視測定を行うための設備を有する。
- 製造施設の構造設備は、円滑かつ適切な作業を行うのに支障のないよう配置されており、清掃および保守が容易である。
- 作業室は、製造する製品の種類、物性および製造工程に応じ、塵埃または微生物による汚染を防止するのに必要な構造および設備を有している。
- 原料や製造中間体などが飛散しやすく、交叉汚染することによりほかの製品に重大な影響を及ぼすおそれのある場合には、それぞれの作業室を分離し、かつ、空気処理システムを別系統にしなければならない。
- 天井、壁および床の表面は、消毒液などによる洗浄に耐える素材で作られている。
- 作業室は、粒子がたまったり気流を妨げたりする可能性のある凹凸構造や、窓、扉周りな

どの横棧のない構造である。

- 設備および器具は、滅菌または消毒が可能な素材で作られている。
- 重要区域においては、製品および重要表面の無菌性を維持するような気流パターンとなっている。
- 異なる清浄度レベルの区域間にはエアロックを設置し適切な室間差圧を維持している。
- 作業室は、作業員以外の者の通路とならないように造られている。
- 複数のロット、または異なる製品が同一作業室で製造される場合には、製品の製造設備が専用かつ閉鎖式である。
- 原料、資材、中間製品および製品を区分して、衛生的かつ安全に貯蔵するために必要な設備を有している。
- 貯蔵設備は、恒温装置、自記温度計そのほか必要な計器を備えたものである。
- 原料、資材および製品の試験検査に必要な設備および器具を備えている。
- 設備や機器類は適切な間隔で点検が行われ、計器類は定期的に校正が行われている。

これらの基準を満たすためには専用の細胞調整施設 (cell processing center : CPC) の設置、またはGMPに準拠したアイソレーターへの導入が不可欠となる。

## IV わが国の現状

探索的臨床試験で用いられる研究用の再生医療用製品の製造様式は多様かつ特殊であり、その特徴に応じた適切な対応が必要である。開発段階に応じた「規制」は安全性の確保と同時に先端医療開発の推進力ともなりうるであろう (stepwise approachの必要性) (図2)<sup>6)</sup>。

薬事法の改正により、医師や医療機関が主導

して行う臨床試験についても一定の条件を満たせば「治験」として位置づけられることが可能となった。この医師主導型治験により、臨床試験で用いられる最新の技術を迅速に医薬品や医療機器として承認申請に反映できるようになった。2006年9月からは「ヒト幹細胞を用いる臨床試験に関する指針」<sup>7)</sup>が施行されている。再生医療の

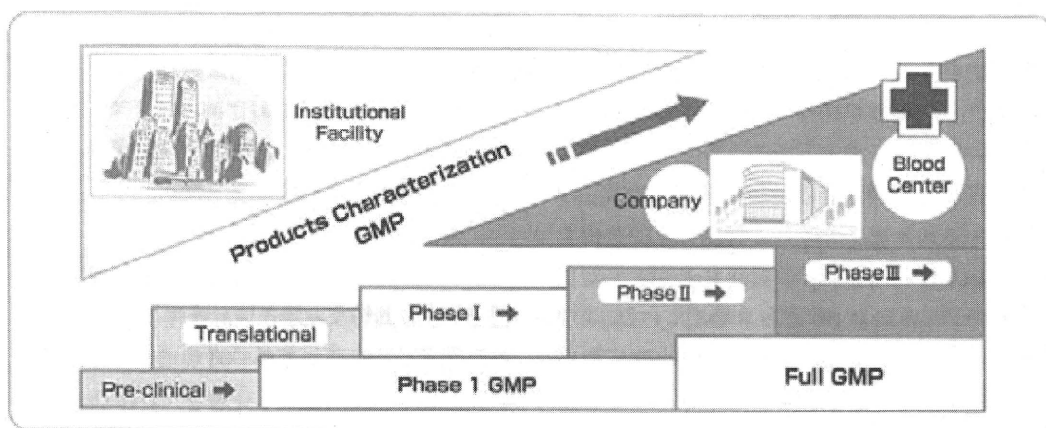


図2 stepwise approachの概念

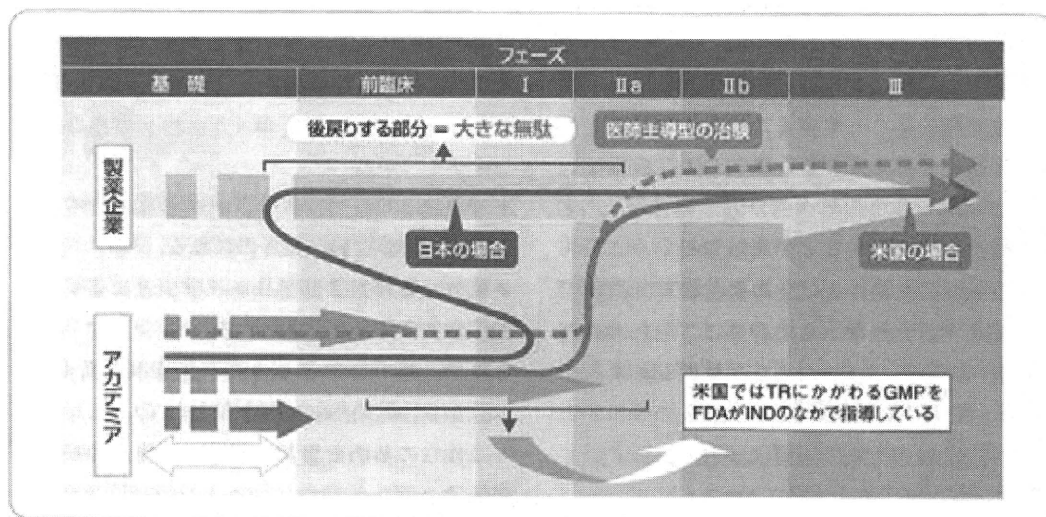


図3 臨床研究と治験システム 一日米の比較

診療試験で用いられる細胞などの調整にかかわる規制の一つであるが、この指針のなかで細胞の調整機関に関する基準は治験薬GMPに準ずることが要求されている。これはFDAのガイドラインと同様に、市販される医薬品に対する厳密なGMPではなく、再生医療用ヒト細胞の安全性を確保しながら臨床試験をスムーズに進められるよう開発段階に応じた規制の内容となっている。

また、米国ではTRの段階からどんな臨床試験であってもINDとしてFDAが把握し品質管

理についても指導を行っているため、有望な結果が得られれば、その後第II相、第III相臨床試験へと移行できる。しかし、わが国では大学などで適切な品質管理がなされていない「院内製剤」を用いて行われる臨床試験について、たとえ良好な結果が得られても、保険取載可能な新しい医療技術とするためには、前臨床試験の段階に戻って安全性の検証からやり直さなければならない。この大きな無駄をなくさなければ技術開発のスピードアップは期待できない(図3)<sup>8)</sup>。さ

らに米国CBER(生物製品評価研究センター)に比べ、わが国のPMDAの生物系審査部担当官の数は驚くほど人数が少ない。今後わが国でも申

請件数が増大することが予測されるためさらなる審査体制の強化が望まれている<sup>6)</sup>。

#### おわりに

再生医療に関する研究の開発スピードを上げるとともに、再生医療にもちいられる組織や細胞の安全性を確保していくことが求められている。わが国において再生治療にかかわる規制の整備と支援体制の構築は急務である。実際、厚生労働省およびPMDAがその支援体制を整えている最中である。開発研究を行っているアカデミアや研究所、それにベンチャー企業などとの

コミュニケーションを十分に図ることが肝要であり、ヒト細胞を用いたGMPに準拠した環境を整えることが不可欠である。そのなかで、「医師主導型治験」は、基礎研究で培われた最先端の再生医療を臨床へ橋渡しをする新しいトラック、すなわち日本版INDシステムとして確立されてゆくことが大いに期待される。



#### 参考文献

- 1) Perry D: Patients' voices: the powerful sound in the stem cell debate. *Science*, 287 (5457): 1423, 2000.
- 2) 田中克平: 薬事法改正等の解説。再生医療に用いられる細胞・再生組織の評価と安全性(大串 始 監修), シーエムシー出版, 東京, 239-254, 2007.
- 3) FDA, CDER: Guidance for Industry: INDs—Approaches to complying with CGMP During Phase 1. CBER, January 2006 (<http://www.fda.gov/cder/guidance/6164dft.htm>)
- 4) 江副幸子, 村山敏典, 西川昭子, 笠井泰成, 川真田伸, 中村憲正, 福島雅典, 前川 平: 産業界のためのガイドライン, INDs—第1相試験におけるCGMPに準拠したアプローチ(邦訳). *臨床評価*, 33(3): 603-624, 2006.
- 5) 治験薬の製造管理及び品質管理基準及び治験薬の製造施設の構造設備基準(治験薬GMP)について。(平成9年3月31日 薬発第480号)
- 6) 前川 平: 探索的臨床試験に求められるGMP基準とは. *臨床評価*, 33(3): 625-627, 2006.
- 7) ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針。(厚生労働省 平成18年7月3日) (<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2006/07/dl/s0727-41.pdf>)
- 8) 笠井泰成, 中川陽子, 松岡玲子, 芦原英司, 木村晋也, 前川 平: 再生医療分野における海外動向。再生医療に用いられる細胞・再生組織の評価と安全性。大串 始(監修), シーエムシー出版, 東京, 288-303, 2007.
- 9) 田中克平: 医薬品医療機器総合機構と再生医療の今後—私案も含めて—。再生医療, 5, 50-59, 2005.

## 8. 本邦における安全な細胞療法の実施に向けて

笠井 泰成<sup>1)</sup>・前川 平<sup>2)</sup>  
Kasai Yasunari Maekawa Taira

京都大学医学部附属病院 分子細胞治療センター<sup>1)</sup>主任<sup>2)</sup>センター長

**Summary** 現在、ヒト由来の細胞・組織を用いた再生医療や細胞治療などの開発が急速に進んでいるが、これらの開発を進めていくなかで、治療に用いられる細胞や組織の高い品質を維持し、安全性をいかに担保していくかは重要な課題のひとつである。また、細胞プロセッシングに関わる法制度の整備も急務とされ、厚生労働省からは細胞治療に関わる指針などが相次いで発表され施行されている。わが国においても細胞治療の開発を推進させるとともに、その安全性を担保するための取り組みがどの様に進められているか述べてみたい。

### はじめに

細胞治療に用いられる細胞・組織などはヒトあるいは動物由来の細胞・組織を加工した医薬品または医療機器のいずれかに定義される。これらを細胞治療に用いる医薬品や医療機器として企業が開発しようとする場合、わが国では薬事法の下でその製造管理や品質管理を行うことになる。しかし、細胞治療に用いられる細胞・組織などの種類や特性、臨床上の適用法は多種多様であり、臨床試験や治験を開始する段階において細胞や組織の安全性および機能の評価方法が必ずしも確立されているとは限らない。細胞治療に関わる臨床試験や治験が進められていく中で、そこで使用される細胞や組織の安全性の確認や機能の評価に必要な

技術を開発して行くことも必要となる。

臨床試験や治験において被験者の安全性を保証することは最も重要なことである。研究成果を臨床の現場に還元し、細胞を用いた新しい治療法を広く国民に提供して行くには、先端医療開発の推進力を高めるとともに、開発の初期段階では安全性を確保しながら柔軟な規制の下で研究開発を支援していく環境の整備が不可欠である。開発段階に応じた GMP、いわゆる phase 1 GMP (われわれが提唱してきた、細胞治療用に特化した institutional GMP (iGMP) と同様の概念) を考慮することも必要となってくる (図 1)<sup>1), 2)</sup>。現在、厚生労働省から出されている指針や指導内容から、安全な細胞治療を開発してゆくために必要なポイントをまとめてみた。

iGMP (institutional GMP)

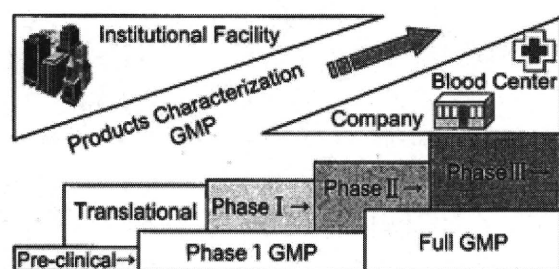


図1 Phase 1 GMPで提唱されている stepwise approach の概念

詳細は本文参照。

## 1. 品質評価のポイント

治験を開始するまでに必要な確認申請では、製品の特性解析が適切に実施され、一定の品質と安全性が担保されるために適切な規格が設定されているかが評価される。しかし、確認申請の段階で必要な規格を決定することが困難な場合には、その時点で得られている品質および安全性に関するデータ、または関連する情報を基に暫定的な規格値を設定する方策も考えられる。

組織や細胞を利用した製品では、通常の医薬品と異なり加熱や濾過などにより細菌やウイルスなどの感染性物質を不活化または除去することが困難であるため、原料の入手から製品の出荷に至るまで交差汚染防止の対策が重要となる。とくに同種細胞の場合、ドナースクリーニングとして HBV (hepatitis B virus), HCV (hepatitis C virus), HIV (human immunodeficiency virus), HTLV (human T cell leukemia virus) や、必要に応じてパルボウイルス B19, サイトメガロウイルスや EB (Epstein Barr) ウイルスについて、血清学的検査あるいは PCR 法などで検査を行う必要がある。ただし、これらのウイルス検査では、高感度な検査方法を用いても検出できないウィンドウ期

HBV (hepatitis B virus) HCV (hepatitis C virus) HIV (human immunodeficiency virus)  
HTLV (human T cell leukemia virus) EB (Epstein Barr)

があることから、適切な時期に再検査を行うことも必要である。また、細胞プロセッシング(細胞の培養や組織の分離などの操作)に用いられる培地や試薬などが最終製品の中に不純物として残留する可能性がある場合には、不純物の量が製品の品質や安全性にどのような影響を及ぼすのかを検討しておくことも必要である。

細胞治療に用いる細胞・組織とともに最終製品の一部を構成する組織・細胞以外の原材料(カプセルやマトリックスなど)がある場合には、その原材料の品質および安全性に関する情報と、その原材料と移植される組織・細胞との相互作用が移植細胞自体に及ぼす影響についても明らかにしておくことが必要である。

治験において被験者の安全性を確保することは最も重要なポイントであり、特に感染性物質や不純物の評価に関する適切な情報が確認申請では求められる<sup>3, 4)</sup>。

## 2. 品質管理上の課題

一般的な医薬品製造の場合、一定の品質を有する製品を恒常的に生産するためにバリデーション(評価と検証)を受けた製造工程の中で品質管理がされている原材料を用いて生産が行われる。しかし、細胞治療で使用される組織や細胞のプロセッシング過程では、(1)原料となる細胞や組織の個体差が大きい、(2)感染性物質の不活化、不純物の除去が困難、(3)細胞や組織の機能評価あるいは品質指標の設定が難しい、(4)製品の製造後、直ちに移植されることが多く、移植までにすべての検査結果が得られない場合もあるなどの特徴があり、一般の医薬品以上に品質管理の難しさがある。しかし、細胞治療の実用化を目指すためには、その時点の技術水準を反映した合理的根拠に基づ

いた手法によって、製品の品質管理と安全性の確認を行うことが望まれる。

原料となる細胞や組織の個体差によって、最終製品の規格や工程内試験の試験結果の値がばらつく場合があるが、目的とする細胞の種類、純度、細胞の本質的な特性などが失われていないことが必須である。また、原材料由来ではあっても、目的以外の細胞の混入や工程由来の不純物（酵素や培地に添加されている成長因子など）については、製造工程内で除去できるようなプロセスを設け、不純物除去のバリテーションを行うこと、および残留物が安全上問題のないことを評価できる規格や試験方法を設定する必要がある<sup>3)</sup>。

感染物質の汚染を防止するためには、原料の受入から製造工程を経て最終製品の出荷、そして移植が行われるまでの各工程での原材料や製品の管理が重要となる。特に製造工程では細胞プロセッシング専用の施設を利用することが不可欠であり、臨床試験においても製造作業施設の構造設備に関しては治験薬 GMP で求められているレベルの施設を使用しなければならない<sup>5), 6)</sup>。詳細については後述する。

細胞や組織を利用した製品の特性や品質解析には、生化学的あるいは免疫学的生産物の測定、形態学的特徴、細胞表面マーカーなどによる確認などの手法が用いられるが、さらに有効な細胞や組織の機能評価を行うためには、臨床試験の進行とともに品質や安全性に関連する適切なパラメータを探索する必要がある。

製品の出荷時には無菌検査やマイコプラズマ否定試験、エンドトキシン測定などが必須の項目だが、製造後直ちに出荷され移植される製品では検査結果が後追いになる場合がある。もし、移植後に出た検査結果で無菌性やマイコプラズマなどが否定できなかった場合には、適切な対応処置が迅速に実施できるよう事前に対応策などを取り決めておく必要がある。

その他、異種動物由来細胞・組織を製造する場合は、「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針について（平成 14 年 7 月 9 日、医政研発第 0709001 号）」に従いドナースクリーニングを行う。また、フィーダー細胞に関しては「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」に基づく 3T3 J2 株及び 3T3 NIH 株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療への指針について（平成 16 年 7 月 2 日、日医政研発第 0702001 号）」に従い品質管理を行う必要がある<sup>7)</sup>。

### 3. 細胞調整を行う施設の基準

探索的臨床試験や第 I 相臨床試験においては、安全性の確保とともに、効率よく開発を進めることが要求される。探索的臨床研究では大学や研究所などの比較的規模の小さな施設において細胞プロセッシングが行われることが多く、そこでは限られたエリア内で多くの製品や複数のロットが扱われる場合も想定される。このような環境では、交差汚染の防止や原材料などの取り間違いを防ぐために、原料、資材、製造中間体、そして製品などの保管管理にも十分な配慮が必要となる。これらの要件を満たしながら、医薬品と同等の品質管理と安全性の担保を高い水準で維持するために必要とされる製造施設の基準は、治験薬 GMP で求められている製造施設の構造設備に関する基準などを参考にして設定する必要がある<sup>5)</sup>。例えば、以下のような条件を満たすように要求されている。

- ・作業管理区域は 4 段階のゾーニングが施され、無菌操作が行える環境を維持する（各区域の清浄度レベルと環境微生物の評価基準は表 1 と表 2 を参照）。
- ・無菌室には専用の前室を附置し、通常当該前室を通じてのみ作業室内に出入りできるような構造とする。

表1 無菌医薬品製造のための空気清浄度

名称	清浄度レベル		最大許容微粒子数/m <sup>3</sup>		USP <1116>の規格	主な作業内容
	grade	0.5 μm 以上				
		非作業時	作業時			
無菌操作重要区域 (層流作業区域)	A	3,530	3,530	クラス 100	開放系調整操作	
無菌操作直接支援区域 (非層流作業区域)	B	3,530	353,000	クラス 10,000	閉鎖系調整操作, 二次更衣	
その他の支援区域	C	353,000	3,530,000	クラス 100,000	組織や細胞の保管, 資材保管, 一次更衣	
その他の支援区域	D	3,530,000	(*1)	(対応する規格なし)	モニタリング, 資材などの受け入れ	

\*1 作業形態により、この区域の許容微粒子数は異なる。

表2 環境微生物の評価基準\*1

グレード	空中微生物数*2 (CFU/m <sup>3</sup> )	最小空気採取量 (m <sup>3</sup> )	表面付着微生物数	
			機器、設備	手袋
			(CFU/24 ~ 30 cm <sup>2</sup> )*3	
A	<1	0.5	<1	<1
B	10	0.5	5	5
C	100	0.2	25	-
D	200	0.2	50	-

\*1 各条件における平均許容上限値を示す。

\*2 スリットサンプラー法又は同等の微生物捕集性能を有する方法を用いての値。

\*3 コンタクトプレート(直径約 5.4 ~ 6.2 cm) 当たりに現れる生菌数を示す。拭き取り法を用いる場合には、25 cm<sup>2</sup> 当たりの表面積の換算値とする。手袋の場合は、通常、5指をプレートに押捺。

(第15改正日本薬局方より引用)

- ・作業室又は作業管理区域は、製造工程に応じて適切な温度、湿度及び清浄度を維持できる構造及び設備を備えている。
- ・温度、湿度、室圧等の環境条件の監視測定を行うための設備を有している。
- ・製造施設の構造設備は、円滑かつ適切な作業を行うのに支障のないよう配置されており、清掃及び保守が容易である。
- ・作業室は、塵埃または微生物による汚染を防止

するのに必要な構造及び設備を有する。

- ・原料や製造中間体などが飛散しやすく、他の製品に影響を及ぼすおそれのある場合には、それぞれの作業室を分離し、かつ空気処理システムを別系統にする。
- ・天井、壁及び床の表面は、消毒液等による洗浄に耐える素材で作られている。
- ・作業室は、粒子が溜まったり気流を妨げたりする構造でないこと。



- ・重要区域においては、製品及び重要表面の無菌性を維持するような気流パターンとなっている。
- ・異なる清浄度レベルの区域間にはエアロックを設置し、適切な室間差圧を維持している。
- ・複数のロット、または異なる製品が同一作業室で製造される場合には、製品の製造設備が専用かつ閉鎖式である。
- ・原料、資材、中間製品及び製品を区分して、衛生的かつ安全に貯蔵するために必要な設備を有している。
- ・貯蔵設備は、恒温装置、自記温度計その他必要な計器を備えたものである。
- ・原料、資材及び製品の試験検査に必要な設備及び器具を備えている。
- ・設備や機器類は適切な間隔で点検が行われ、計器類は定期的に校正を行う。

## おわりに

現在、ヒトまたは動物由来の成分を用いた細胞療法に関わる指針として「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について（医薬発第1314号：平成12年12月26日）」がその規制の中核となっているが<sup>4)</sup>、

平成19年9月には自己由来に限定した細胞・組織加工製品などの品質および安全の確保に関する指針案が厚生労働省から提示され、パブリックコメントの募集が行われた。今後、細胞治療の安全性を高めていくために、様々な角度から適切な規制の整備も進められて行くであろう。

## 文献

- 1) 前川 平：探索的臨床試験に求められるGMP基準とは。臨床評価 33 (3) : 625-627, 2006
- 2) 笠井泰成, 中川陽子, 松岡玲子, 芦原英司, 木村晋也, 前川 平：再生医療分野における海外動向。再生医療に用いられる細胞・再生組織の評価と安全性 (大串 始 監修), シーエムシー出版, 東京, pp.288-303, 2007
- 3) 安藤 剛, 鹿野真弓, 田中克平：細胞組織利用製品の評価の視点。再生医療 5 : 22-26, 2005
- 4) ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について (医薬発第1314号：平成12年12月26日)
- 5) ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針 (厚生労働省：平成18年7月3日)
- 6) 治験薬の製造管理及び品質管理基準及び治験薬の製造施設の構造設備基準 (治験薬 GMP) について (薬発第480号：平成9年3月31日)
- 7) 福永悟史, 鹿野真弓, 田中克平, 早川堯夫：細胞組織利用製品の品質確保。再生医療 5 : 27-32, 2005



# Potential of dendritic cell immunotherapy for relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, shown by WT1 peptide- and keyhole limpet hemocyanin-pulsed, donor-derived dendritic cell vaccine for acute myeloid leukemia

Toshio Kitawaki,<sup>1</sup> Norimitsu Kadowaki,<sup>1\*</sup> Tadakazu Kondo,<sup>1</sup> Takayuki Ishikawa,<sup>1</sup> Tatsuo Ichinohe,<sup>1</sup> Satoshi Teramukai,<sup>2</sup> Masanori Fukushima,<sup>2</sup> Yasunari Kasai,<sup>3</sup> Taira Maekawa,<sup>3</sup> and Takashi Uchiyama<sup>1</sup>

**Induction of leukemia-specific immune responses is a promising treatment for acute myeloid leukemia. A 58-year-old woman received Wilms' tumor 1 (WT1) peptide- and keyhole limpet hemocyanin (KLH)-pulsed, donor-derived dendritic cell (DC) vaccination for AML relapse after allogeneic stem cell transplantation. The vaccination induced immune responses to the naive antigen KLH, whereas definitive immune responses to WT1 were not detected. Leukemia gradually progressed despite of vaccination. This study indicates that DC vaccination can induce an antigen-specific immune response in a patient after allogeneic stem cell transplantation, thus representing a viable strategy to induce antigen-specific immune responses in such patients. Am. J. Hematol. 00:000–000, 2008. © 2007 Wiley-Liss, Inc.**

## Introduction

A graft-versus-leukemia (GVL) effect is the main mechanism by which allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) eliminates residual leukemic cells. The GVL effect is also exploited in donor lymphocyte infusion (DLI) for relapse after allo-SCT. However, DLI often provokes graft-versus-host disease (GVHD), because a wide array of allogeneic antigens is targeted. It may be possible to procure a GVL effect without GVHD by inducing immune responses exclusively to leukemia-associated antigens. Wilms' tumor 1 (WT1) is such a promising target for leukemia-specific immunotherapy, because it is expressed in a majority of cases of acute leukemia and is apparently immunogenic as shown by spontaneous immune responses in leukemic patients [1–4], even after allo-SCT [5]. Indeed, clinical trials of WT1 peptide vaccination have shown immunological as well as clinical responses in a substantial number of cases [3,6].

Administration of ex vivo generated, antigen-pulsed dendritic cells (DC) (also called "DC vaccine") is currently under vigorous exploration in clinical trials of tumor immunotherapy. It has been suggested that DC vaccination may be superior to other types of vaccination methods, such as peptide vaccinations and viral vectors, in clinical efficacy for melanoma [7]. Thus, we hypothesized that induction of a WT1-specific immune response by DC vaccination may be effective to treat AML relapse after allo-SCT. We performed a phase I/IIa clinical trial to test safety and immunogenicity of WT1 peptide-pulsed DC vaccination in AML patients who relapsed after allo-SCT. As monocytes from a posttransplant patient have been shown to be defective in the ability to differentiate into DC [8], we used monocytes from the allo-SCT donor as a cellular source of DC. Here, we report the first case in our trial that completed the DC vaccination.

## Case Report

A 58-year-old woman was diagnosed as AML FAB M4 with t(11;17)(q23;q25) translocation. Although complete remission (CR) was achieved by chemotherapy with cytarabine and daunorubicin, the leukemia relapsed after 7 months. It was refractory to salvage chemotherapy, and with overt leukemia, the patient underwent reduced-inten-

sity allo-SCT from an HLA-matched sibling donor using a conditioning regimen composed of fludarabine, busulfan, and low-dose (2 Gy) total body irradiation 2 months after the relapse. Tacrolimus and short-term methotrexate were administered for prophylaxis of acute GVHD. The patient established complete chimerism without acute GVHD, and second CR was achieved. However, 3 months after transplantation, the leukemia relapsed. Tacrolimus were discontinued to induce a GVL reaction, but no clinical response or GVHD was observed.

The patient was HLA-A\*2402-positive, and met eligibility criteria of the clinical trial, which was approved by the institutional review board of Kyoto University Hospital. DC vaccines were generated at the cell processing facility of Kyoto University Hospital under good manufacturing practice (GMP) conditions. CD14<sup>+</sup> cells were isolated from peripheral blood mononuclear cells of the allo-SCT donor by ClinMACS using CD14 Microbeads (Miltenyi Biotec). Fresh monocytes were used for the generation of the first vaccine, and frozen monocytes were thawed and used for the generation of the following cycles of vaccines. The CD14<sup>+</sup> cells were cultured in RPMI1640 supplemented with 2% plasma of the donor in the presence of 800 IU/ml GM-CSF and 500 IU/ml IL-4. At Day 6, fresh medium containing 2 µg/ml keyhole limpet hemocyanin (KLH) and maturation-inducing factors consisting of 10 ng/ml TNF-α, 10 ng/ml IL-1β, 1000 IU/ml IL-6, and 1 µg/ml prostaglandin E<sub>2</sub> was added. KLH was used to assess the ability of DC to induce

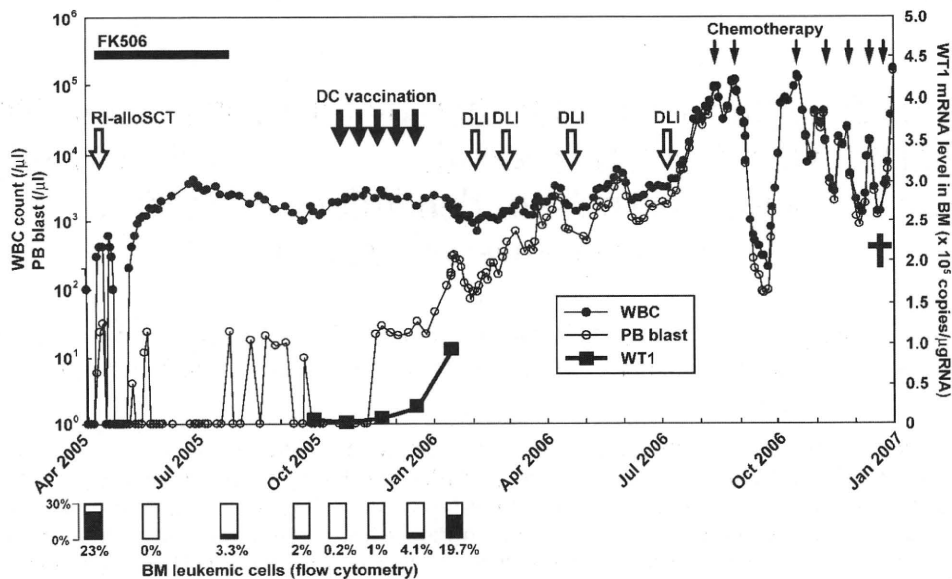
<sup>1</sup>Department of Hematology and Oncology, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan; <sup>2</sup>Department of Clinical Trial Design and Management, Translational Research Center, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan; <sup>3</sup>Center for Cell and Molecular Therapy, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan

\*Correspondence to: Norimitsu Kadowaki, Department of Hematology and Oncology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, 54 Shogoin Kawara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan.  
E-mail: kadowaki@kuhp.kyoto-u.ac.jp

Received for publication 6 August 2007; Revised 16 October 2007; Accepted 20 November 2007

Am. J. Hematol. 00:000–000, 2008.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).  
DOI: 10.1002/ajh.21127

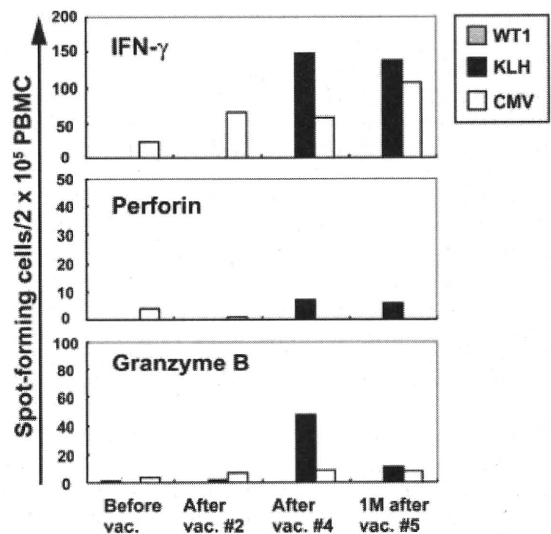


**Figure 1.** The clinical course of the patient. Starting 6 months after transplantation, the patient was given DC intradermally every 2 weeks for five doses in a dose-escalating manner, starting with  $1 \times 10^6$  cells, next  $5 \times 10^6$  cells, and a maximum number of  $1 \times 10^7$  cells from the third cycle. BM: bone marrow, DC: dendritic cell, DLI: donor lymphocyte infusion, PB: peripheral blood, RI-alloSCT: reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation.

immune responses in a posttransplant patient, and to provide WT1-specific CD8<sup>+</sup> T cells with CD4<sup>+</sup> T-cell help. At Day 8, 10  $\mu$ M HLA-A\*2402-restricted WT1 modified peptide [9] (CYTWNQMNL, residues 235–243), which has tyrosine instead of methionine at the second residue to enhance the affinity to the HLA molecule, was pulsed for the last 4 hr. Then, DC were used for vaccination.

Starting 6 months after transplantation, the patient was given DC intradermally every 2 weeks for five doses (Fig. 1). Local erythema and itching of Grade 2 were observed at the injection sites. There was no GVHD or other adverse reaction of the vaccines. The percentage of leukemic cells and the expression level of WT1 mRNA in the bone marrow gradually increased during and after the vaccinations. Although the patient received DLI and chemotherapy, she died of sepsis 13 months after the completion of the vaccination. We closed the clinical trial only with this case due to difficulty in recruiting eligible patients.

As immunological monitoring, skin DTH tests using donor-derived mature DC pulsed with the WT1 peptide, KLH, or no antigen were performed. Before DC vaccination, there was no DTH reaction to WT1 or KLH. After the fourth vaccination, a strong DTH reaction to KLH-pulsed DC (48 hr after injection, erythema of 30 mm  $\times$  21 mm and induration of 24 mm  $\times$  17 mm) was observed, which was much stronger than the reaction induced by unpulsed DC (erythema of 9 mm  $\times$  9 mm and no induration), indicating that the DC vaccination induced a KLH-specific immune response. The skin reaction to WT1 peptide-pulsed DC was erythema of 12 mm  $\times$  10 mm and induration of 10 mm  $\times$  10 mm. The induction of induration by WT1 peptide-pulsed but not unpulsed DC implies a WT1-specific immune response, although not definitive. The immune response to KLH was also demonstrated by IFN- $\gamma$ , perforin, and granzyme B ELISPOT assays using unstimulated peripheral blood mononuclear cells (Fig. 2) as well as bone marrow cells (data not shown). However, an immune response to the WT1 peptide was not detected by ELISPOT, using either peripheral blood or bone marrow cells, unstimulated or after in vitro stimulation with the WT1



**Figure 2.** ELISPOT assay for WT1 peptide, KLH protein, and CMV peptide. IFN- $\gamma$ , perforin, and granzyme B ELISPOT assays were performed using ELISPOT kits (Mabtech). PBMC of the patient were collected and frozen at the indicated time points until use. Donor-derived mature DC were generated from frozen CD14<sup>+</sup> cells, pulsed with one of the indicated antigens, and used as a stimulator. As a positive control, HLA-A\*2402-restricted CMV pp65 peptide (QYDPVAALF) [10] was used. PBMC of the patient were plated at  $2 \times 10^5$  cells/well with stimulator cells (PBMC: stimulator = 10:1) in 96-well, capture antibody-precoated PVDF plates (Millipore). After 40 hr of incubation, spots were developed using an AEC substrate according to the manufacturer's instructions. Spots were counted by an automated ELISPOT reader (CarlZeiss). The numbers of antigen-specific spot-forming cells were calculated by subtracting the numbers of spots with unpulsed DC. WT1 peptide did not induce a detectable level of specific spots.

peptide for a week. A WT1 modified peptide/HLA-A\*2402 tetramer did not detect specific CD8<sup>+</sup> T cells in peripheral blood and bone marrow, unstimulated or after in vitro stimulation, although the tetramer detected WT1 peptide-specific CD8<sup>+</sup> T cells from a healthy donor, which were obtained by repetitive stimulation with WT1 peptide-pulsed DC (data not shown).

### Discussion

Although responses to vaccination for various infections are impaired after allo-SCT [11], effective antitumor immunity can be elicited by tumor vaccination after allo-SCT in murine models [12–14]. There have been two reports on DC vaccination after allo-SCT in humans. In the first report, four patients were vaccinated with donor-derived DCs pulsed with autologous tumor cells for relapse of leukemia or lymphoma [15]. The injected cell populations contained substantial numbers (~40%) of T cells primed in vitro. Cytotoxicity of T cell lines against autologous tumor cells was observed in vitro in two patients, and decreases in tumor cell numbers in peripheral blood were observed in three patients. However, it is not clear which cells were responsible for the immune responses, T cells stimulated by DCs in vivo or contaminating T cells stimulated by DCs in vitro before injection. In the second report, one patient was vaccinated with donor monocyte-derived DCs pulsed with autologous tumor lysate for progression of renal cell carcinoma after allo-SCT [8]. Neither DTH reaction to DCs pulsed with tumor lysate nor a clinical response was observed. Here, we observed a strong immune response to a naïve antigen KLH added to DCs, as demonstrated by DTH and ELISPOT assays. Thus, this is the first report showing unequivocally that DCs are capable of inducing an antigen-specific immune response, even though the vaccines are administered 6 months after allo-SCT. This indicates that DC vaccination may be a viable strategy for antigen-specific immunotherapy after allo-SCT. Although DCs pulsed with KLH have been shown to induce an immune response in all the healthy individuals [16] and in the majority of melanoma patients [17], it has not been examined whether KLH induces an immune response in posttransplant patients. Our study shows that KLH is also useful to assess the ability of DC to induce immune responses in a posttransplant patient.

DTH tests, which reflect in vivo accumulation of specific T cells at injected sites, might have an advantage in detecting a rare population of T cells over ELISPOT or HLA tetramer assays, which analyze only limited numbers of T cells contained in peripheral blood samples. Indeed, positive DTH tests with negative tetramer staining in peripheral blood have been reported in other vaccination trials [18,19]. We observed the induction of induration in skin DTH using WT1 peptide-pulsed but not unpulsed DC, implying the induction of a WT1-specific immune response. To definitively show specificity to the WT1 peptide, it will be useful to perform in situ tetramer staining or tetramer analysis of lymphocytes liberated from the DTH skin lesion, as recently shown [18].

Absence of clinical efficacy in the present patient may be due to insufficient potency of WT1-specific responses for growing leukemic cells. To obtain clinical efficacy, it may be important to select patients who already have detectable WT1-specific memory CD8<sup>+</sup> T cells before vaccination, to

develop DC that can induce more potent antileukemic immunity, or to apply DC vaccines to patients with less tumor burden, for example, patients with minimal residual disease or in remission.

### Acknowledgments

We thank Dr. Kiyotaka Kuzushima (Aichi Cancer Center, Japan) for providing us with tetramers of HLA-A\*2402/peptides from WT1, CMV pp65, or HIV gag protein.

### References

1. Scheibenbogen C, Letsch A, Thiel E, et al. CD8 T-cell responses to Wilms tumor gene product WT1 and proteinase 3 in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2002;100:2132–2137.
2. Rezvani K, Grube M, Brenchley JM, et al. Functional leukemia-associated antigen-specific memory CD8<sup>+</sup> T cells exist in healthy individuals and in patients with chronic myelogenous leukemia before and after stem cell transplantation. *Blood* 2003;102:2892–2900.
3. Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, et al. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:13885–13890.
4. Rezvani K, Brenchley JM, Price DA, et al. T-Cell responses directed against multiple HLA-A\*0201-restricted epitopes derived from Wilms' tumor 1 protein in patients with leukemia and healthy donors: Identification, quantification, and characterization. *Clin Cancer Res* 2005;11:8799–8807.
5. Morita Y, Heike Y, Kawakami M, et al. Monitoring of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Cancer* 2006;119:1360–1367.
6. Mailander V, Scheibenbogen C, Thiel E, et al. Complete remission in a patient with recurrent acute myeloid leukemia induced by vaccination with WT1 peptide in the absence of hematological or renal toxicity. *Leukemia* 2004;18:165–166.
7. Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 2005;5:296–306.
8. Tatsugami K, Eto M, Harano M, et al. Dendritic-cell therapy after non-myeloablative stem-cell transplantation for renal-cell carcinoma. *Lancet Oncol* 2004;5:750–752.
9. Tsuboi A, Oka Y, Udaka K, et al. Enhanced induction of human WT1-specific cytotoxic T lymphocytes with a 9-mer WT1 peptide modified at HLA-A\*2402-binding residues. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:614–620.
10. Kuzushima K, Hayashi N, Kimura H, et al. Efficient identification of HLA-A\*2402-restricted cytomegalovirus-specific CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes by a computer algorithm and an enzyme-linked immunospot assay. *Blood* 2001;98:1872–1881.
11. Ljungman P, Engelhard D, de la Camara R, et al. Vaccination of stem cell transplant recipients: Recommendations of the Infectious Diseases Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant* 2005;35:737–746.
12. Anderson LD Jr, Savary CA, Mullen CA. Immunization of allogeneic bone marrow transplant recipients with tumor cell vaccines enhances graft-versus-tumor activity without exacerbating graft-versus-host disease. *Blood* 2000;95:2426–2433.
13. Teshima T, Mach N, Hill GR, et al. Tumor cell vaccine elicits potent antitumor immunity after allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Cancer Res* 2001;61:162–171.
14. Moyer JS, Maine G, Mule JJ. Early vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells after allogeneic bone marrow transplantation has antitumor effects. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:1010–1019.
15. Fujii S, Shimizu K, Fujimoto K, et al. Treatment of post-transplanted, relapsed patients with hematological malignancies by infusion of HLA-matched, allogeneic-dendritic cells (DCs) pulsed with irradiated tumor cells and primed T cells. *Leuk Lymphoma* 2001;42:357–369.
16. Dhodapkar MV, Steinman RM, Sapp M, et al. Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J Clin Invest* 1999;104:173–180.
17. Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, et al. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 2001;61:6451–6458.
18. de Vries IJM, Bernsen MR, Lesterhuis WJ, et al. Immunomonitoring Tumor-specific T cells in delayed-type hypersensitivity skin biopsies after dendritic cell vaccination correlates with clinical outcome. *J Clin Oncol* 2005;23:5779–5787.
19. Thomas-Kasel A-K, Zeiser R, Jochim R, et al. Vaccination of advanced prostate cancer patients with PSCA and PSA peptide-loaded dendritic cells induces DTH responses that correlate with superior overall survival. *Int J Cancer* 2006;119:2428–2434.