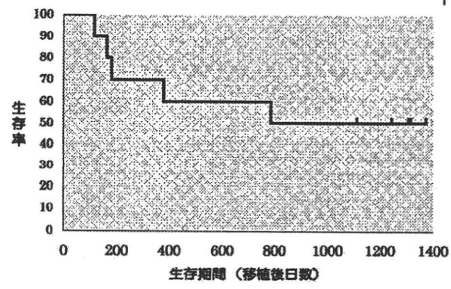


## 第I相試験 症例経過

※原発がんが原因で死亡した場合は、CRを達成しなかったとしても、CRを達成したと見做す。

#	好中球 >500/ml	血小板 >2万/ml	aGVHD	免疫 抑制剤	PS	転帰
001	11	11	0			dead CR⇒Re⇒再移植⇒死亡(786)
002	14	14	I			dead CR⇒Re⇒再移植⇒死亡(163)
003	12	14	0	(-)	80	alive CR⇒Re⇒GO+DLI⇒CR(1373+)
004	12	12	0			dead nonCR⇒再移植⇒死亡(181)
006	14	17	Ⅲ <sup>1)</sup>	(-)	100	alive CR(1217+)
007	低下せず		I	(-)	100	alive CR(1307+)
008	10	10	0	(+)	100	alive CR(1244+)
009	11	11	I			dead CR⇒PCP⇒死亡(CR, 379)
010	13	18	Ⅲ <sup>2)</sup>	(+)	100	alive CR(1111+)
011	12	12	I			dead CR, GVHD⇒TMA⇒死亡(116)

## 第I相試験 全生存率



## 第I相試験のまとめ

- Primary endpointである生着に関し、顆粒球系細胞は全例において速やかに完全キメラとなった。1例はT細胞で混合キメラとなり、免疫抑制の中止で完全キメラとなった。
- CMV抗原血症は陽性になったが、100日以内は重篤な有害事象は認めなかった。
- aGVHDは5例に認めたがⅡ度以上は2例であった。
- 10例中全例が100日以上生存した。

## 第II相 症例背景 (現在17例)

#	病名	病期	年齢・性別	ドナー	HLA mis GvH/HvG
101	AML	PIF	49F	Son	3/3
102	ALL	L2	58F	Daughter	2/1
103	MDS/ML	RA/PIF	52F	Sib	2/1
104	AML M4E	1 <sup>st</sup> Re	38F	Son	2/2
105	ALL	PIF	54F	Son	2/2
106	AML	PIF	51M	Son	2/3
107	MDS	RAEB	59M	Daughter	2/2
108	AML	PIF	50F	Daughter	2/2
109	ALL	CR2	51M	Son	2/2
110	ML	3 <sup>rd</sup> Re	53M	Daughter	2/2

#	病名	病期	年齢・性別	ドナー	HLA mis GvH/HvG
111	FL	1 <sup>st</sup> Re	49M	Son	2/3
112	MDS	RAEB	56M	Son	2/1
113	PTCL	Re(allo)	50F	Daughter	3/2
114	CML	CP2	54M	Daughter	2/3
115	AML	1 <sup>st</sup> Re	46M	Daughter	3/3
116	AML	PIF	42F	Son	
117	AML	Re(allo)	52M	Brother	3/2

登録施設： 富山県立中央病院、兵庫医科大学、倉敷中央病院、岡山大学

## 現在の状況

- 第I相10例に引き続き、現在第II相試験を施行中（現在17例）。
- 第I相、第II相合わせて、35例まで施行予定（あと8例）。

### 最近登録例が入らない理由

Blast>30%の症例が多い。

よりaggressiveな症例には、BUを MEL 140mg/m<sup>2</sup>に変更して用いることが多くなった。

## 難治性GVHDに対する少量ATG療法 臨床データ/相対効果

### <対象>

1. ステロイド抵抗性急性GVHD: mPSL (換算) で1mg/kg以上の治療により3日間の治療で進行 or 5日間の治療で不変 or 7日間の治療で治癒せず
  2. 急性GVHDの明らかな症状があり、TMAなどの合併症によりステロイド増量が不可能な症例。
  3. 急性GVHDはステロイドによってほぼCRとなっているが、ステロイド減量により再燃するため、減量できない症例。
- ・ 活動性の感染症を有する症例は除外する。

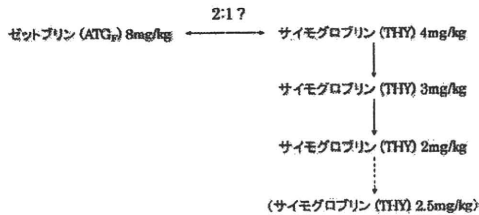
### <治療プロトコル>

ゼットプリン注 2mg/kg、週1回投与。  
効果が不十分であれば、1回の投与量を4mg/kgまで増量可。  
他の免疫抑制剤は、すでに入っているものは併用可とするが、増量はしない。可能であれば減量する。

## 症例経過

#	aGVHD			Steroid sparing effect	Side effect	Present at death
	Skin	gut	liver			
ATG-01	1→0	0→0	0→0	+	CMV antigenemia, PCP	DPS
ATG-02	2→0	0→0	0→0	+	-	Dead(GVHD)
ATG-03	2→0	0→0	0→0	+	-	DPS
ATG-04	1→0	0→0	0→0	+	relapse	Dead(ATLL)
ATG-05	2→0	0→0	0→0	+	mycobacterium	DPS
ATG-06	3→1	1→0	0→0	+	CMV antigenemia	DPS
ATG-07	3→NE	1→NE	2→NE	NE	relapse	Dead(AML)
ATG-08	1→0	0→0	0→0	+	relapse	Dead(AML)
ATG-09	0→0	0→0	0→0	+	relapse	Dead(AML)
ATG-10	3→0	4→1	0→0	+	-	DPS
ATG-11	0→0	1→0	1→0	+	-	Dead(GVHD)
ATG-12	2→0	0→0	0→0	+	-	DPS
ATG-13	3→0	1→1	0→0	+	aspergillus	DPS

## HLA半合致ミニ移植におけるATGの適正量



## 背景と目的

本研究として行っている血縁HLA半合致移植(haplo-mini)では、ATGとしてゼットプリン(ATG<sub>r</sub>)を用いている。しかしその研究期間中にサイモグロリン(THY)が、移植前処置として保険適応を受けた。

我々は両抗体の変換比を2:1と仮定し、従来ATG<sub>r</sub> 8mg/kg (2mg/kg/day \* 4days)で行っていたところを、THY 4mg/kg (1mg/kg/day \* 4days)に変更して用いた。

この変換比が、造血幹細胞移植領域において適正かどうか、移植後の各リンパ球分画の回復と比較した。

## 方法

後ろ向き(カルテベース)症例対照研究

## 対象

2006年6月から2009年10月までに、兵庫医大血液内科で行った血縁HLA半合致ミニ移植(haplo-mini)で、移植後8週(day 56)までに、1週間以上の間隔で少なくとも2回以上リンパ球分画(CD3, CD4, CD8, CD19, CD56)を測定している症例とした。56日以内の早期死亡例は除いた。

2008年11月まではゼットプリンATG<sub>r</sub>を用い、当院で保険診療として処方できるようにした2008年12月以降は、サイモグロリンTHYを用いた。2008年12月以降でも、班会議登録症例はゼットプリンATG<sub>r</sub>を用いている。

## 移植方法(血縁HLA半合致移植)

前処置は、FLU/BU/ATG又は、FLU/MEL/ATGを主体とし、腫瘍量減量が必要な場合は、適宜high dose AraCを加えた。

GVHD予防は、tacrolimus (target conc. 10-12ng/ml) + mPSL 1mg/kg/dayを基本とし、50歳以上の症例ではMMF 15mg/kg/dayを加えた。

THY群では、THY 4mg/kg, 3mg/kg, 2mg/kgと減量していった。ただし最終投与日はDay -1に揃えている。

# 平成 22 年度 厚生労働科学研究 第 2 回合同班会議 プログラム・抄録集

## 研究班名：

### <免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業>

- ・ 灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植療法：基礎から臨床へ  
研究代表者 池原 進 (関西医科大学 共同研究講座 幹細胞異常症学)
- ・ 組織適合性に基づく非血縁者間造血幹細胞移植の成績向上に関する研究  
研究代表者 森島 泰雄 (愛知県がんセンター 血液・細胞療法部)
- ・ 同種末梢造血幹細胞移植を非血縁者間で行う場合等の医学、医療、社会的基盤に関する研究  
研究代表者 宮村 耕一 (名古屋第一赤十字病院 血液内科/造血細胞移植センター)
- ・ 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  
研究代表者 谷口 修一 (虎の門病院 血液内科)
- ・ 臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究  
研究代表者 加藤 俊一 (東海大学医学部基盤診療学系 再生医療科学)

### <がん研究開発費>

- ・ 成人難治性造血器腫瘍に対する非血縁者間の同種造血幹細胞移植法の確立に関する研究  
主任研究者 森島 泰雄 (愛知県がんセンター 血液・細胞療法部)

日 時：平成 23 年 1 月 29 日(土)・30 日(日)

会 場：東京医科歯科大学湯島キャンパス M&D タワー2 階大講堂

## 平成 22 年度厚生労働科学研究 第 2 回合同班会議

研究班名：

＜免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業＞

- ・ 灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植療法：基礎から臨床へ  
研究代表者 池原 進 （関西医科大学 共同研究講座 幹細胞異常症学）
- ・ 組織適合性に基づく非血縁者間造血幹細胞移植の成績向上に関する研究  
研究代表者 森島 泰雄 （愛知県がんセンター 血液・細胞療法部）
- ・ 同種末梢血幹細胞移植を非血縁者間で行う場合等の医学、医療、社会的基盤に関する研究  
研究代表者 宮村 耕一（名古屋第一赤十字病院 血液内科／造血細胞移植センター）
- ・ 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  
研究代表者 谷口 修一（虎の門病院 血液内科）
- ・ 臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究  
研究代表者 加藤 俊一（東海大学医学部基盤診療学系 再生医療科学）

＜がん研究開発費＞

- ・ 成人難治性造血器腫瘍に対する非血縁者間の同種造血幹細胞移植法の確立に関する研究  
主任研究者 森島 泰雄 （愛知県がんセンター 血液・細胞療法部）

期 日：2011 年 1 月 29 日（土）

10：00～12：00 池原班  
12：00～13：00 昼食  
13：00～15：00 森島班（組織適合性）  
15：00～16：00 森島班（がん研究）  
16：00～17：30 宮村班

2011 年 1 月 30 日（日）

09：00～11：30 加藤班  
11：30～12：30 昼食  
12：30～15：00 谷口班  
15：30～18：00 合同公開シンポジウム

会 場：東京医科歯科大学湯島キャンパス M&D タワー2 階大講堂  
東京都文京区湯島 1-5-45 （JR、東京メトロ 御茶ノ水駅下車）

事務局：東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学内 TEL：0463-93-1121（内 2311）

1 日 目

平成 23 年 1 月 29 日(土)

## 造血細胞移植合同班会議（厚労科学研究）

1月29日（土）

灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植療法：基礎から臨床へ（H22-免疫-一般-009）  
研究代表者 池原 進（関西医科大学 共同研究講座 幹細胞異常症学）

10:00-10:15(討論含む)

1. 移植後肺障害に関するマウスモデルを用いた造血幹細胞の静脈内と骨髄内輸注法の比較  
品川克至、山筋好子、前田嘉信（岡山大学 病院血液・腫瘍内科）

10:15-10:30(討論含む)

2. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞における HLA クラス Ib 分子の発現に関する検討  
一戸辰夫<sup>1</sup>、吉岡 聡<sup>1</sup>、三浦康生<sup>2</sup>（<sup>1</sup>京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科、  
<sup>2</sup>京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部）

10:30-10:45(討論含む)

3. マイナー抗原ワクチンの進捗状況について  
赤塚美樹、森島泰雄（藤田保健衛生大学医学部 血液内科）

10:45-11:00(討論含む)

4. 難治性ウイルス感染症に対するウイルス抗原特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) の  
体外増幅における問題点とその対策  
高橋義行、小島勢二（名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学）

11:00-11:15(討論含む)

5. 造血細胞移植後の免疫学的モニタリング  
森尾友宏（東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・発生発達病態学分野）

11:15-11:30(討論含む)

6. 骨髄内臍帯血移植とヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針  
村田 誠（名古屋大学医学部附属病院 血液内科）

11:30-11:45(討論含む)

7. 灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植の問題点  
谷口享子、吉原 哲、小川啓恭（兵庫医科大学 内科学講座 血液内科）  
森 眞一郎、野村昌作（関西医科大学 内科学第一講座 血液内科）  
中村修二、池原 進（関西医科大学 共同研究講座 幹細胞異常症学）

11:45-12:00(討論含む)

8. 新しい骨髄移植方法の最新の知見と今後の見通し  
池原 進（関西医科大学 共同研究講座 幹細胞異常症学）

### 【目的】

移植後肺障害 Idiopathic pneumonia syndrome (IPS)は、移植後に感染症以外の原因による肺障害により発症する予後不良な肺合併症である。原因として肺への放射線照射の影響やドナー免疫担当細胞の関与が考えられている。ドナー免疫担当細胞を含む造血幹細胞は、静脈内骨髄移植 (iv-BMT) 後では多くが肺へトラップされるが、骨髄内骨髄移植 (intra-BMT) では少ないと考えられる。マウスモデルでは intra-BMT では iv-BMT よりも GVHD が抑制されることが報告されているが、我々は intra-BMT では iv-BMT よりも IPS の発症が軽減されるとの仮説を立て、マウスモデルを用いて IPS に対する intra-BMT の影響に関して iv-BMT と比較検討を行った。

### 【方法】

Donor マウスには C57BL/6J を用い、RT で前処置したレシピエントマウス B6D2F1 に iv BMT と intra-BMT を行い比較検討した。移植後に体重、GVHD スコアおよび生命予後を評価、また移植後 6 週間後に気管支肺胞洗浄 bronchoalveolar lavage (BAL) を行い、回収液中の細胞を解析した。また、肺組織の病理所見を検討した。さらに donor マウスに FVB/N lac<sup>+</sup>、レシピエントに BALB/c を用いた系で、IVIS imaging system により移植後輸注細胞の体内分布の時間的、場所的推移に関して iv-BMT と intra-BMT で比較検討した。

### 【結果と考察】

このモデルでは、intra-BMT で in-BMT に比べて、移植後の体重減少は少ない傾向にあり、また GVHD スコアが低かった。これらの因子が移植後の全身状態に有利に作用したと考えられ、結果として生存率が高かった。また移植 6 週後の BAL による解析では、回収洗浄液中の総細胞数および T 細胞数は、intra-BMT において iv-BMT よりも少ない傾向にあり、組織学的にも intra-BMT において細胞浸潤、組織障害が軽度であった。さらに IVIS imaging system による輸注された移植細胞の体内動態解析では、Intra-BMT では iv-BMT に比し移植後早期 (1h-6h) では輸注された移植細胞の肺へのトラップが軽減されていた。肺に存在するドナー細胞は移植後 6h まで低下 (肺から流出) するが、その後、肺におけるドナー細胞は同種移植群にのみ増加し続け、アロ免疫反応と考えられた。以上から IPS は intra-BMT において軽度である可能性が示唆され、移植後早期の移植細胞の肺へのトラップがこれらの現象に関与していると考えられた。

## ヒト骨髄由来間葉系幹細胞における HLA クラス Ib 分子の発現に関する検討

一戸 辰夫<sup>1</sup>、吉岡 聡<sup>1</sup>、三浦 康生<sup>2</sup>

<sup>1</sup>京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学

<sup>2</sup>京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部

**[背景]** 骨髄内骨髄移植療法では、従来より多くのドナー由来間葉系幹細胞（MSC）が同所的に移植されるため、MSC が内在的に有する免疫調節作用を賦活化するような薬理学的手法の開発が移植後の免疫学的合併症の制御に有用である可能性がある。本研究では、胎盤に特異的に強く発現し、母子間免疫寛容の維持機構への関与が示唆されている HLA クラス Ib 分子（HLA-E, HLA-F, HLA-G）が MSC を介する免疫調節作用の担い手となり得る可能性に着眼し、これらの MSC における機能的発現の確認と薬理学的な発現制御法を探索することを目標としている。前回の会議においては、ヒト骨髄あるいは歯胚に由来する複数の MSC 細胞株において、HLA-G に関しては、既報と異なり mRNA・タンパク質いずれの検出も困難であったことを報告した。今回は、引き続き、MSC における HLA-F の発現を検討するための予備的実験を行ったので、その結果について報告を行う。

**[方法]** HLA-F は多くの細胞で細胞内タンパク質としてのみ検出可能であり、細胞表面への発現はまれとされているため、染色特性と認識部位の異なる 3 種類の HLA-F モノクローナル抗体（3D11, 4A11, 4B4）を用いて HTLV-I 感染 T 細胞株 7 株 [SY, MT-1, MT-2, HUT102, SYK-11L(+), ATL-43T, ED-40515(+)] における HLA-F の発現をフローサイトメトリーで解析した。

**[結果および考察]** 今回検討した HTLV-I 感染 T 細胞株のすべてに、3D11, 4A11 を用いて HLA-F の細胞表面への発現を確認することが可能であった。HLA-F の正確な機能はまだ明らかにされていないが、最近の研究により、ペプチドやβ2ミクログロブリンと会合していない HLA クラス I 分子重鎖（"open HLA class I conformers"）の細胞膜への輸送に関与することによって、活性化リンパ球等の免疫応答様式を制御している可能性が示唆されている。今後、今回特性の確認された HLA-F 抗体を用いて、ヒト骨髄由来 MSC における HLA-F の発現についての検討を行っていく予定である。

本研究は、菱澤 方勝博士・三浦 晶子博士（京都大学大学院医学研究科）、下嶋 典子博士・石谷 昭子博士（奈良県立医科大学）、Daniel E. Geraghty 博士（Fred Hutchinson Cancer Research Center）との共同研究である。



「灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植療法：基礎から臨床へ」班  
 平成 23 年 1 月 29-30 日 平成 22 年度第 2 回造血幹細胞移植合同班会議  
 於：東京医科歯科大学湯島キャンパス

「マイナー抗原ワクチンの進捗状況について」

赤塚美樹（藤田保健衛生大学血液内科、愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部）  
 森島泰雄（愛知県がんセンター中央病院・血液・細胞療法部）

血液腫瘍に対する抗原特異的免疫療法として、WT-1 や PR-3 などの腫瘍関連抗原ペプチドワクチンや樹状細胞ワクチンが一定の効果を上げている。また移植関係では、多発性骨髄腫に対するパラプロテインを移植ドナーに免疫してから移植を行う方法が実施され、少数例ながら良好な結果が報告されている。HLA 一致移植では、腫瘍関連抗原以外にマイナー組織適合抗原（mHag）が強力な標的抗原とされている。本研究では、移植後の再発予防および再発治療を目標としたマイナー抗原ワクチンの安全性と至適投与量および免疫誘導能について臨床研究を実施中である。

マイナー抗原ワクチン臨床試験の現状：臨床試験開始後 4 年で、79 症例がマイナー抗原（mHag）タイピングを受け、うち 50 例がドナーとペアでタイピングを受けた。18 ペア（36%）において現在ペプチドワクチン準備の済んでいる mHag である ACC-1<sup>Y</sup>, ACC-1<sup>C</sup> (HLA-A\*24:02), ACC-2 (HLA-B\*44:03/B\*44:02), HA-1 (HLA-A\*02:01/A\*02:06) ACC-6 (HLA-B\*44:03/B\*44:02)のいずれかの mHag で GVL 方向の不適合を認めた。これらのうち、再発例 3 例と再発ハイリスク例 3 例の合計 6 例において、実際にワクチンの投与がなされた。

UPN	年齢	診断	病期	ドナー	mHAg	備考
VAC-001	47	PTCL-u	移植後再発	非血縁	ACC-1C A*24:02	13ヶ月 再発
VAC-002	27	T-ALL	寛解	HLA 一致 同胞	HA-1/ A*02:06	再発ハイリスク
VAC-003	32	T-ALL	寛解	2座不一致 臍帯血	ACC-1C A*24:02	再発ハイリスク
VAC-004	19	B-ALL	寛解	非血縁 (8/8)	ACC-1Y A*24:02	再発ハイリスク
VAC-005	22	AML (M2) t(8;21)	移植後再発	非血縁 (7/8; C座)	ACC-1C A*24:02	22ヶ月 分子再発
VAC-006	54	MM (IgA)	移植後再発	HLA 一致 同胞	ACC-1C A*24:02	24ヶ月 再発

## 【結果】

再発ハイリスク例においては接種後も再発を見ていない。再発例に対する予防ワクチンでは、2例でPD、1例は経過観察中である。

いずれの症例も有害事象は局所反応だけであったが、局所の発赤が一過性の症例もあれば、1週間以上持続し、掻痒感の強かった症例もあった。免疫学的反応については、未刺激の状態でも、また *in vitro* で mHag 刺激した後でも 30  $\mu$ g 接種例では誘導出来なかった。300  $\mu$ g 接種例については解析中である。

## 【考察】

【今後】また当初は mHag の GVL 方向不適合と拘束性 HLA アリルが存在する症例は 20%程度であったが、症例の蓄積と共に 36%と理論値である 37.5%に近づいてきた。これは当初血縁者間移植が多かったが、その後非血縁骨髄や臍帯血ドナーからの移植が増えたためと考えられる。今後、まだ実施されていない ACC-2 および ACC-6 不適合症例のリクルートと、HA-1 および ACC-1 症例の 300  $\mu$ g、1mg の接種例を蓄積したい。

以前我々はセントラルメモリー形質をもつ ACC-1<sup>Y</sup> 特異的 CTL が末梢血より骨髄中により多く存在することを過去に報告しており、ワクチン接種後に骨髄穿刺液が得られた場合は、骨髄液中の CTL の増減を検討する予定である。VAC-5 において骨髄が採取されているので、今後慎重に解析を行っていく。

## 【謝辞】

症例のご登録またはワクチン接種にご協力いただいた下記の研究協力者の先生方に謝意を表します。 齋藤文護（昭和大学医学部）、榎葉誠（名古屋第一赤十字病院）、後藤辰徳（名古屋第一赤十字病院）、渡邊慶介（名古屋第一赤十字病院）、宮村耕一（名古屋第一赤十字病院）、井根省二（愛知県がんセンター）、山本一仁（愛知県がんセンター）、田地浩史（愛知県がんセンター）

## 難治性ウイルス感染症に対するウイルス抗原特異的細胞障害性 T 細胞(CTL)の体外増幅における問題点とその対策

名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学 高橋義行、小島勢二

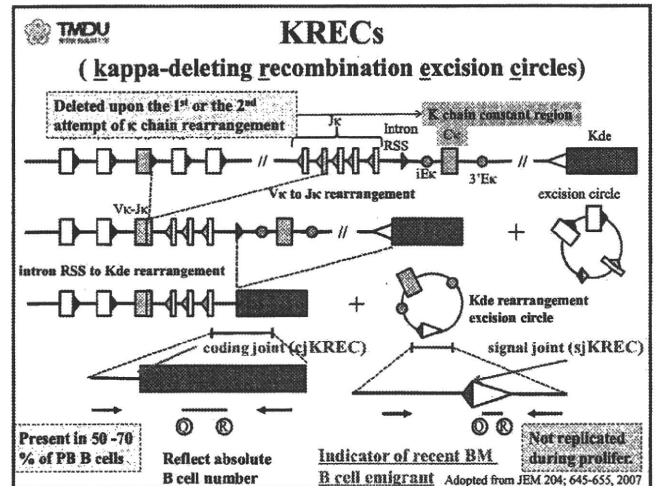
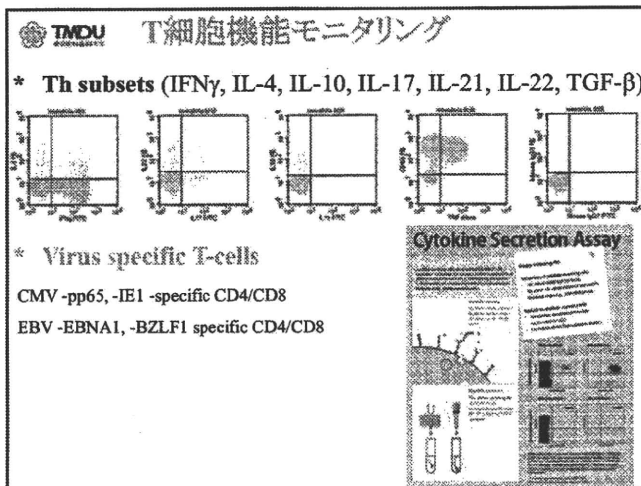
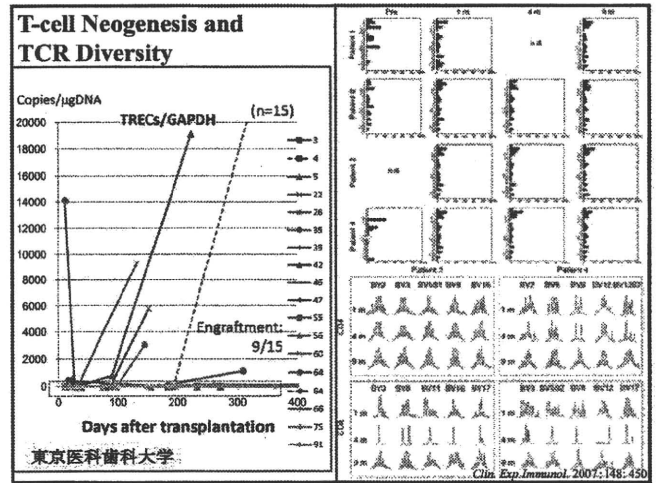
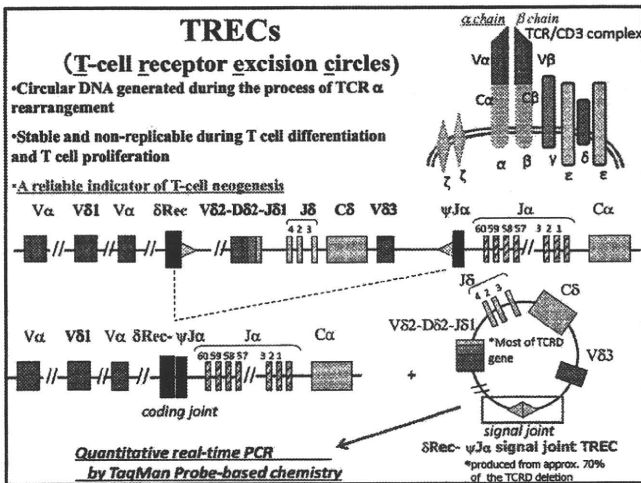
【目的】造血幹細胞移植後の患者におけるウイルス感染症は、移植前処置に ATG を用いた場合や GVHD の治療中など強い免疫抑制下で重篤化しやすく、そのコントロールは移植を成功させるために重要である。現在わが国では抗ウイルス薬による治療が行われているが、抗ウイルス薬耐性の症例や、抗ウイルス剤による副作用などの問題がある。欧米の一部の施設では造血幹細胞移植後難治性ウイルス感染症に対してウイルス抗原特異的 CTL の臨床応用が行われ優れた効果が報告されている。我々はウイルス既感染の健常人ドナーより CMV, EBV 特異的 CTL の体外増幅法を開発し臨床第 1 相試験を行っている。ウイルス特異的 CTL 培養には 1 ヶ月程度の時間を要し、一旦凍結保存した CTL の細胞上清中の細菌、真菌、ウイルスについて検査が必要である。臨床スケールで CTL を大量培養した症例において病原体が検出される頻度とその対策について検討した。【方法】HLA-A2 または A24 陽性健常人の末梢血 30ml から単核球を分離し、ウイルス特異的ペプチドで刺激後、IL-2 添加培地で 1 週間培養し、その後我々の開発した方法にもとづき CD3 で刺激した T 細胞に抗原ペプチドをパルスしたものを抗原提示細胞とし T 細胞に加え閉鎖培養無菌バッグにより培養した。増幅した CTL の細胞数、MHC-tetramer 陽性細胞の濃度により、投与基準を満たしたものを凍結保存し、培養上清を用いて細菌培養、BD グルカンの検出、ウイルス DNA の検出を行い、検出頻度について検討した。本研究に登録された造血細胞移植の HLA-A2 または A24 陽性ドナーより培養した CTL 16 ライン (CMV-CTL が 6、EBV-CTL が 10) を対象とした。【結果】培養は CMV が 6 名、EBV が 10 名で行い、それぞれ 4 名、4 名で初回投与基準を満たす細胞数の増殖が得られた。細菌、真菌が検出された症例はなかったが、CMV-CTL 培養 6 例中 3 例に、EBV-CTL 培養 10 例中 8 例に EBV-DNA が検出された。EBV-CTL 培養上清に EBV-DNA が認められた 3 例で凍結細胞を融解、生食で 2 回洗浄したものの細胞成分より抽出した DNA では 2 例が検出感度以下であった。また同じ 3 例で溶解した CTL を用いて Flow-FISH 法を用いて生細胞の EBER 陽性率を測定したところ、3 例すべて感度以下であった。【結論】我々の培養法において EBV-CTL 培養上清中に検出される EBV-DNA については、感染力のないものと考えられた。これまで GCV 耐性 CMV 感染を起こした患者 2 名に対し CMV-CTL の投与を行った。いずれも投与後の発熱、発疹などの急性反応はなく、他に重篤な合併症も認めていない。1 名の患者で投与後 CMV-DNA の低下、消失を認めている。今後移植前処置に抗胸腺グロブリンの使用例が増加しており、難治性ウイルス感染の増加が懸念される。海外ではウイルス特異的 CTL 療法による予防投与や、ウイルス特異的 CTL をあらかじめ培養凍結しておく CTL バンクの有用性も報告されている。わが国においてもウイルス特異的 CTL バンクを含めた細胞療法の整備が必要である。

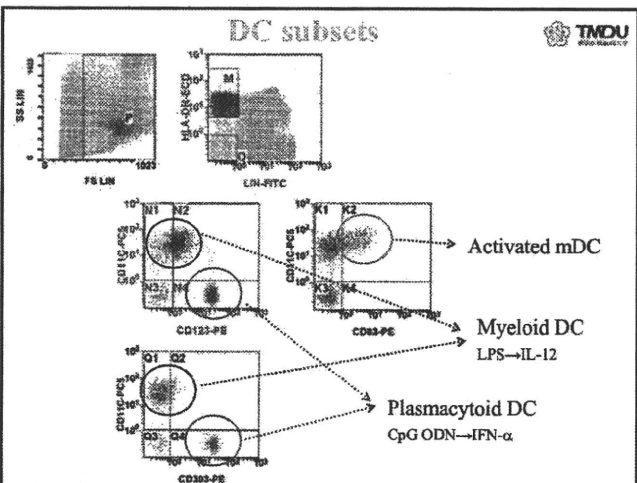
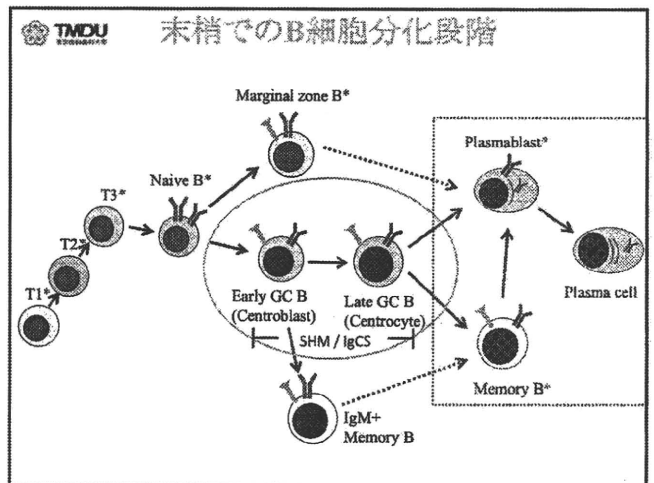
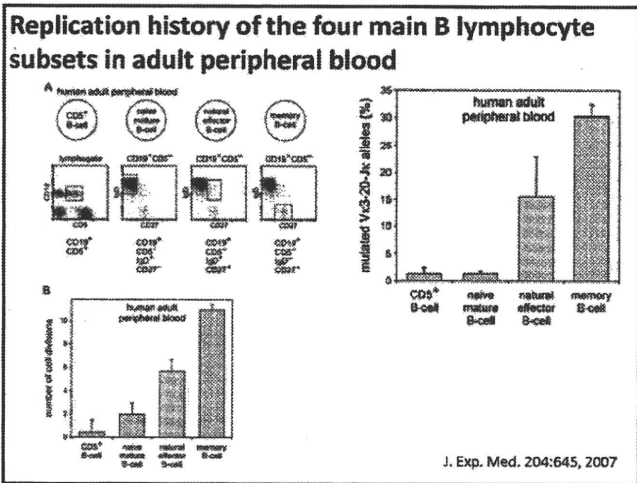
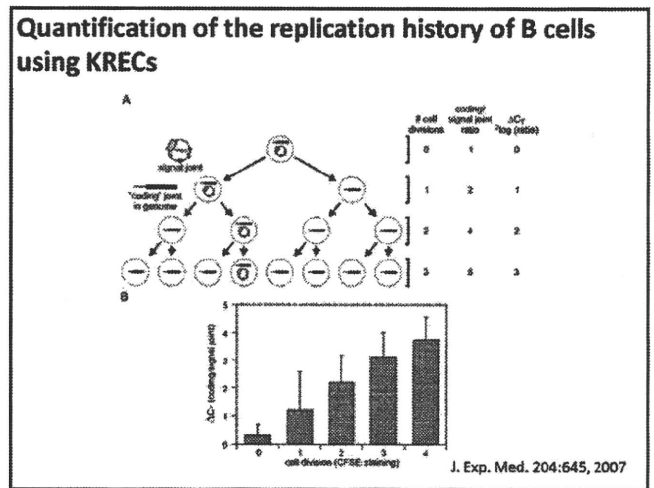
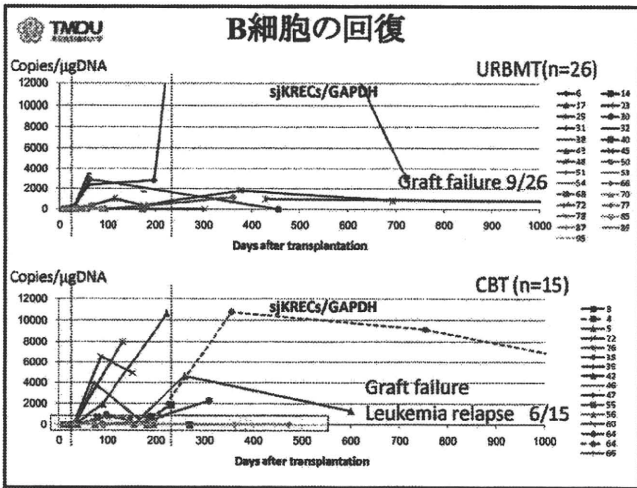
## 造血細胞移植後の免疫学的モニタリング

東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野  
同医学部附属病院・細胞治療センター  
森尾友宏

### 一般的免疫学的指標 +

- # T細胞新生能
- # T細胞機能
- # B細胞新生能
- # B細胞サブセット
- # DCサブセットと機能





### Contributors

東京医科歯科大学医学部細胞治療センター  
 大山 敦、落合 央、峯岸志津子、清水則夫、梶原道子

東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野  
 寺田尚美、富澤大輔

防衛医科大学校医療情報部  
 今井耕輔

防衛医科大学校小児科  
 中川紀子、野々山恵章

関西医科大学共同研究講座幹細胞異常症学  
 池原 進

「骨髄内臍帯血移植とヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」

分担研究者：村田 誠（名古屋大学医学部附属病院血液内科）

骨髄非破壊的前治療を用いた非血縁臍帯血移植における生着率向上を目指し、同種造血幹細胞移植の適応でありながら骨髄または末梢血幹細胞提供ドナーが得られない成人血液悪性疾患患者を対象として、骨髄内臍帯血移植の臨床試験を実施している。

本試験では、1) 解凍した臍帯血細胞浮遊液から DMSO を含む保存液を除去する過程（血清除去と同じ）が含まれるが、臍帯血幹細胞に対する加工や培養は一切行わないこと、2) 臍帯血を静脈内ではなく骨髄内に輸注する過程が含まれるが、骨髄内への点滴は輸血を含めて我が国の保険診療として認められていること、そして3) 造血幹細胞移植としての臍帯血幹細胞の使用は、指針発表前より実地医療として行われてきたこと、などから本試験は「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」には該当しないと考えていた。しかし昨年、本試験は本指針に該当するのではないかとの指摘を受けた。

改訂された厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の確認も含めて、本試験と本指針との関係について考察してみたい。

## 灌流法により採取された骨髄細胞を用いた 骨髄内骨髄移植の問題点

谷口享子、吉原 晋、小川啓森 (兵庫医科大学、内科学講座血液内科)  
森 真一郎、野村昌作 (関西医科大学、内科学第一講座血液内科)  
中村修二、池原 進 (関西医科大学、共同研究講座 幹細胞異常症学)

2011.1.29 東京医科歯科大学

## 試験の目的

- 安全性および有効性の検討 (臨床第I/II相試験)
- ドナー
  - 主要評価項目: 灌流法による骨髄採取に伴う安全性をprimary endpointとする
- レジビエント
  - 主要評価項目: 第I相試験では、骨髄投与方法(骨髄内骨髄移植)の安全性をprimary endpointとする。第II相試験では、ドナー型生着率をprimary endpointとする。

関西医科大学と兵庫医科大学の共同で、以下の2例の灌流法による骨髄内骨髄移植の臨床試験を実施

### 2010.7.30 骨髄採取

患者: ALL, relapse, 56歳F  
前処置: Flu/CA/Mel/TBI 3Gy/Thymo(2)  
ドナー: 息子 (GVH 3Ag/HVG 0Ag)

### 2010.8.13 骨髄採取

患者: HL, CBSCT後relapse, 27歳M  
前処置: Flu/CA/Mel/TBI 3Gy  
ドナー: 弟 (GVH 3Ag/HVG 2Ag)

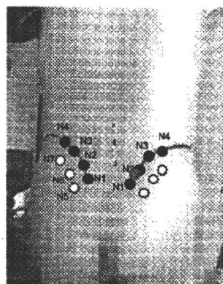
## 灌流法による骨髄採取の利点

### 末梢血の混入が非常に少ない

- 赤血球の混入少ない
- 遠心分離操作のみで、volumeを減らし、骨髄単核分画を容易に回収可能であり、そのまま骨髄内へ移植できる
- T細胞%低く、CD34%高い

### 1例目の骨髄採取の結果

反省会議事録より



1. 左右腸骨、N1-N4からの灌流で、骨髄有核細胞数は必要数の1/3程度であった。また、細胞の性質は吸引法で採取された骨髄細胞に比較して優位性を示さなかった。

2. ヘモグロビン量は吸引法に比較して少なかったのに対して、T細胞の混入率は吸引法で採取された骨髄細胞に比較して高く、その原因に対して論理的な解釈は現時点で出来ない。

最低必要有核細胞数 =  $1.0 \times 10^6/\text{kg}$

2例目: (8/13)左右の腸骨で、灌流法と吸引法を比較し、灌流法が優れていることを確認後、骨髄内移植を行うものとした

採取骨髄細胞の性状比較 1回の灌流に生食30ml使用

	採取量 (ml)	WBC	RBC	Hct%	CD3(+)%	CD34(+)%
N1-N2灌流 1回目 (左側)	19 ml	Total $5.9 \times 10^8$	$316 \times 10^4/\mu\text{l}$	27.6	9.2	0.9
N1-N2灌流 2回目	17 ml	Total $2.4 \times 10^8$	$264 \times 10^4/\mu\text{l}$	22.9	10.8 (T細胞混入率 10.0%)	0.9
N1-N2灌流 3回目	20 ml	Total $1.8 \times 10^8$	$218 \times 10^4/\mu\text{l}$	18.9	11.5%	0.9
合計	56 ml	Total $10.1 \times 10^8$		23.1		
N1-N2吸引 (右側)	3 ml	Total $2.3 \times 10^8$	$352 \times 10^4/\mu\text{l}$	31.4	14.8%	1.3

### 2010.7.30/8.13の両日、灌流法による骨髄採取

いずれも、骨髄内骨髄移植には至らなかった

1. 赤血球の混入率が多く、遠心だけの処理で、骨髄内移植にもって行くことができなかった。
2. 同時に吸引法による骨髄細胞を行い、採取された細胞成分につき、両者の比較がなされたが、CD34%、T細胞混入率において、灌流法の吸引法に対する優位性は、証明できなかった。

### 灌流法による骨髄採取の前提

1. 骨髄内のHb値は、末梢血に比べて、ずっと低い

通常の骨髄検査の際、一般検査を測定した

WBC 3.35万/ $\mu$ l, Hb 12.1 g/dl

→ Hb値は、末梢血とほぼ同等

2. 吸引法では、末梢血の混入率が高い

採取量に依存しており、3 ml程度では、末梢血の混入は少ない?

### 採取された細胞の中身からの解析

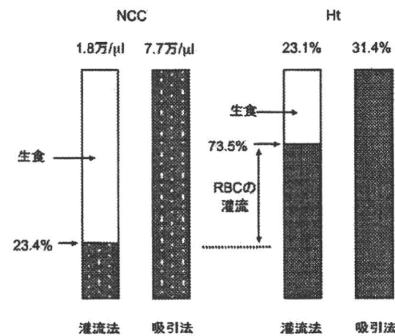
CD34(%) (骨髄にある細胞の代表として)

	7/30 (1例目)	8/13 (2例目)
灌流法	1.29%	0.9%
吸引法	1.45%	1.3%

→ 吸引法はCD34(+)細胞をより多く採取できる  
 → 吸引法で骨髄細胞を多く採取できる、しかし差は少ない

2例目のdata解析から

灌流法では、骨髄内(静脈洞?)のRBCが有核細胞に比して、採取されやすい



### 考察

灌流法は、吸引法に比べて、採取の際、骨髄腔内の流れが遅い?

↓  
 接着している有核細胞に比して、浮遊しているRBCは、採取されやすい?

採取される有核細胞の内容において、現在のところ、灌流法と吸引法で有意の差は認めていない

灌流法で、輸血なしに採取可能には疑問が残るが、骨髄内移植で少量の幹細胞で生着するなら、意味がある

灌流法で、本当にstromal cellが多く採取できるのか、検証する必要がある

### 今後の研究の方向性

1. 灌流法の方法を改善することにより、灌流法の吸引法に対する優位性を、ヒトで証明する必要がある
2. 採取方法にこだわらず、骨髄内へ移植することの有用性を検討することも、並行して行う (吸引法によるIBM-BMT)
3. 骨髄内に移植すると、本当に、生着にpositiveなeffectがあるのかを、mechanismの解明と合わせて、検証する必要がある
4. 腸骨の骨髄腔内の体積は、片側120 ml (MRI画像を基にした計算)  
 採取液から、RBCを除去する方法論を確立する必要がある



## I. 最新の知見

- 1) これまで、研究代表者らが、提唱して来た“自己免疫疾患造血幹細胞異常症”説が、ヒトでも、認められるようになり、2010年の5月号の“Science”に掲載された(328: 825-826, 2010)。  
ヒトでも、自己の幹細胞移植では、長期間観察すると再発するが、同種移植では、少数ではあるが長期間治癒している。池原も共著者に加わり、我々の過去のマウスの論文も2編が引用されている。
- 2) 2型の糖尿病のモデルマウスで良く知られた db/db マウスを用いて、IBM-BMT に胸腺移植(TT)を併用することによって、2型の糖尿病を治療することができることを発見した(J. Autoimmunity 35: 414-423, 2010)。2型の糖尿病も1型と同様に発症に免疫学的機序(自己免疫?)が関与していることを示唆する所見で、重要な発見と考える(2010年9月13日の毎日新聞で紹介)。
- 3) ウサギでは、アロのBMTの成功率が悪いが、その原因としては、ドナー由来のT細胞が回復してくるまでに感染で死亡するためである。しかしながら、haploidentical BMTにおいては、PMとIBM-BMTの組合せによって、移植の成功率をあげることができることを明らかにした(Transplant. Immunology 24: 33-39, 2010)。

## I I. 今後の見通し

- 1) 新しい”Stem Cell Disorders”の概念の確立と治療法の開発
  - i) Hemopoietic Stem Cell Disorders: Leukemia, Autoimmune Diseases, etc.
  - ii) Mesenchymal Stem Cell Disorders: Osteoporosis, Type 2 Diabetes, etc.
- 2) 灌流法と吸引法のヒトでの比較
  - i) volunteerを募って、同一人の腸骨を用いて、右腸骨より灌流法を、左腸骨より吸引法を実施し、採取骨髄液中の細胞成分(特に赤血球とT細胞の混入度やCFU-C, CFU-f assayによるHSCとMSCの数)の比較を行う。赤血球除去には、HESを用いる。
- 3) 灌流法の安全性と有用性が判明すれば、灌流法+IBM-BMTのPhase I/II Studyを実施する。

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業  
「組織適合性に基づく非血縁同種造血幹細胞移植の成績向上に関する研究」班  
(H20-免疫-一般-014)

平成 22 年度 第 2 回班会議 プログラム  
2011 年 1 月 29 日 (土) 午後 1 時～午後 3 時  
東京医科歯科大学

座長 森島泰雄 (13:00 - 14:00)

1. 組織適合性研究班のまとめ

主任研究者 森島泰雄

2. 移植に関する組織適合性抗原の統合解析

松尾恵太郎\* 愛知県がんセンター研究所疫学予防部

組織適合性研究班 班員・研究協力者

3. HLA ハプロタイプ保存性の意義と今後の方向性

森島聡子\*<sup>1)</sup>、小川誠司<sup>2)</sup>、松原亜以子<sup>2)</sup>、柏瀬貢一<sup>3)</sup>、笹月健彦<sup>4)</sup>、森島泰雄<sup>5)</sup>

1) 藤田保健衛生大学血液内科

2) 東京大学医学部附属病院がんゲノミクスプロジェクト

3) 東京都赤十字血液センター検査部

4) 九州大学生体防御医学研究所

5) 愛知県がんセンター中央病院

4. SNP タイピングデータに基づく HLA ハプロタイプ推定の妥当性について

松原亜以子\*<sup>1)</sup>、森島聡子<sup>2)</sup>、柏瀬浩一<sup>3)</sup>、鬼塚真仁<sup>4)</sup>、小寺良尚<sup>5)</sup>、

森島泰雄<sup>6)</sup>、小川誠司<sup>1)</sup>

1) 東京大学医学部附属病院がんセンターボード

2) 藤田保健衛生大学血液内科

3) 東京都赤十字血液センター

4) 東海大学血液内科

5) 愛知医科大学

6) 愛知県がんセンター中央病院

5. HLA1 座不一致骨髄移植後患者における HLA 特異的 CTL からの白血病エスケープ

加藤智則\*、寺倉精太郎、西田徹也、村田 誠、直江知樹

名古屋大学大学院 血液・腫瘍内科学

6. Scanning of the Immunogenome for GVHD genetic risk loci with microsatellite markers.

Christian Harkensee\* (1,2), Akira Oka (1), Makoto Onizuka (1), Peter G Middleton (2), Hidetoshi Inoko (1), Andrew R Gennery (2), Kiyoshi Ando (1), Hirofumi Nakaoka (1), Yasuo Morishima (3) for JMDP.

1) Tokai University, School of Medicine

2) Newcastle University, Institute for Cellular Medicine, Newcastle upon Tyne, UK.

3) Aichi Cancer Center

7. Non-HLA SNP polymorphisms and HSCT outcome: A systematic approach.

Christian Harkensee\* (1,2), Akira Oka (1), Makoto Onizuka (1), Peter G Middleton (2), Hidetoshi Inoko (1), Andrew R Gennery (2), Kiyoshi Ando (1), Hirofumi Nakaoka (1), Yasuo Morishima (3) for JMDP.

1) Tokai University, School of Medicine

2) Newcastle University, Institute for Cellular Medicine, Newcastle upon Tyne, UK.

3) Aichi Cancer Center

8. 非血縁者間骨髄移植における Granzyme B 遺伝子多型解析

Jルイス・エスピノーザ、高見昭良\*、中尾眞二

金沢大学附属病院血液内科・輸血部

9. NK 受容体 KIR ハプロタイプと非血縁者間造血細胞移植成績

中本貴之\*、柏瀬貢一、小川篤子、佐竹正博、高梨美乃子、

屋部登志雄

東京都赤十字血液センター

10. HLA クラス I 認識 LILR 受容体多型と非血縁者間骨髄移植成績

平安恒幸\*<sup>1,2</sup>、中本貴之<sup>1</sup>、柏瀬貢一<sup>1</sup>、佐竹正博<sup>1</sup>、屋部登志雄<sup>1</sup>

1) 東京都赤十字血液センター

2) 大阪大学免疫学フロンティア研究センター

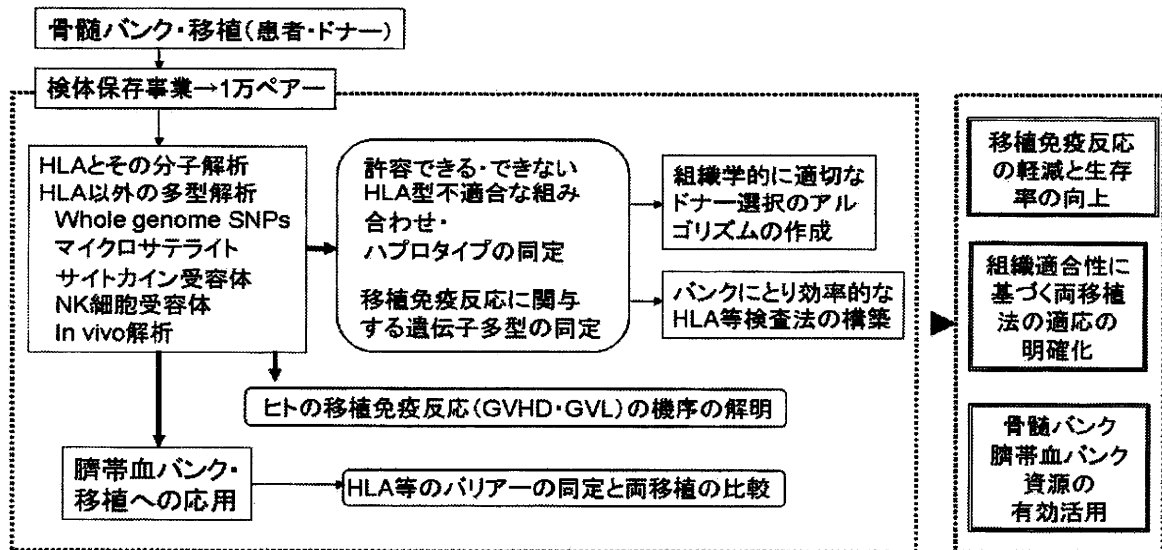
(\*)発表者

「組織適合性に基づく非血縁同種造血幹細胞移植の成績向上に関する研究」班

(H20-免疫-一般-014)

1. 組織適合性研究班のまとめ (H20年度～H22年度前半)

研究代表者：愛知県がんセンター中央病院 森島泰雄  
 研究分担者：東海大学医学部 猪子英俊 九州大学 笹月健彦  
 東京大学附属病院 小川誠司 東京都赤十字血液センター 屋部登志雄  
 名古屋大学医学部 村田 誠 金沢大学附属病院 高見昭良  
 研究協力者



研究目的

本研究は、JMDPを介した患者とドナーのペアの同意が得られた検体を保存し、より精緻な細胞遺伝学的手法（HLAとその分子解析、HLAハプロタイプ解析、HLA遺伝子以外の多型解析（Whole genome SNPs、マイクロサテライト、サイトカイン受容体、NK細胞受容体）、In vitro解析）を用い、HLAとHLA以外の組織適合性抗原とその多型が移植免疫反応に与える影響を明らかにする。これら患者とドナーの組織学的な情報と臨床情報に基づき、適切なドナー選択の個別化アルゴリズム（基準）を構築することを目的とする。

研究成果

1. HLA適合度が移植免疫反応に与える影響の解析

1) 検体の調整とHLA検査法の確認

約1000ペアのHLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1の遺伝子型を同定した。さらに、従来の保存DNAも加えて、whole genome 増幅法を用い、約2000検体を増量し、解析用サンプルセット作成を可能にした。

健常者503人を対象として最も高精度とされるSBT法（自家製）と現在HLA-A, -B, -DR検査に用いられている蛍光ビーズ法「WAKFlow HLAタイピング試薬 HLA-C（湧永製薬）」とによる大規模HLA-C頻度調査を実施し、両方法を比較検討した。HLA-Cタイピングでは503件中、1例に新アレルCw\*0303Vが検出された。Cw\*0303Vは非同義置換を伴う新アレルでWAKFlow HLAタイピング試薬 HLA-Cでは通常のCw\*0303と判定された。この1例を除き蛍光ビーズ法で得られた結果とSBT法との結果はすべて一致した（一致率99.8%）。

このことから、SBT法と比べ多数検体処理能に優れた蛍光ビーズ法においても、HLA-C座の検査が可能であることが確認された。（2）市販のWGAキット3種類を用いて全ゲノム増幅効率と増幅前後検体によるHLAタイピング結果を比較し、最適な系（約1万倍の増幅率）を決定し、東海大学と協力して同系を用いて患