

臍帯血リンパ球を主成分とする細胞治療製剤の 医薬品化に関する研究

所 属 国立成育医療研究センター研究所 母児感染研究部
研究者 藤原成悦
研究期間 平成 22 年 4 月～平成 24 年 3 月

研究要旨 臍帯血活性化 DLI に関して、安全管理法の確立を含めた基盤整備とマウスモデルによる前臨床研究を行った。さらに「ハイリスク臍帯血移植患者に対する臍帯血活性化 DLI に関する臨床第 I 相試験実施計画書」を策定し、臨床試験実施の準備を完了した。

研究分担者

- (1) 東京医科歯科大学難治疾患研究所 清水則夫
- (2) 東京医科歯科大学大学院 森尾友宏
- (3) 国立成育医療研究センター研究所 小児血液・腫瘍研究部 清河信敬
- (4) 日本大学医学部 麦島秀雄
- (5) 株式会社リンフォテック 茅野真一
- (6) 神鋼病院 血液内科 伊藤仁也
- (7) 東京大学医科学研究所 長村登紀子
- (8) 虎ノ門病院 血液内科 谷口修一

A. 研究目的

臍帯血移植では、患者の状態に合わせて最適な時期に移植できる利点がある一方、生着不全率が 20-30%と非常に高いこと、移植後の免疫能の回復が遅く感染症の頻度が高いこと、再発した場合には、ドナーリンパ球輸注 (DLI) が行えないことが大きな問題となっている。これらを解決する手段としてごく少量の移植用臍帯血からリンパ球をサイトカインで増幅させ、移植後に輸注する臍帯血ドナー活性化 T 細胞輸注療法 (臍帯血活性化 DLI) を臨床応用するためにこれまで安全性、有効性に関するデータの蓄積を行ってきた。本研究では、①臍帯血活性化 DLI のマウスモデルによる前臨床研究を行い、その作用メカニズムを解明すること、②臍帯血活性化 DLI に用いる細胞製品の安全性を担保するために、

様々な品質管理法および安全管理法を確立すること、③第 I 相臨床試験を実施し、ヒトにおける安全性・有効性を検証すること、④これらの研究をモデルとし、同じく臍帯血リンパ球を原材料として、制御性 T 細胞を選択的に増幅し、移植片対宿主病などの治療に用いるための基礎研究および前臨床研究を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1. 臍帯血移植後の生着不全の成因に関する研究

虎の門病院の臍帯血移植 458 症例を対象として、移植後 28 日以内の早期死亡例や再発例を除いた 383 例のうち、生着不全の定義を満たした 35 例を対象とした。

2. 臍帯血移植および非血縁者間骨髄移植後の中後期におけるウイルス感染症の検討

虎の門病院で臍帯血移植 (CBT) 又は非血縁者間骨髄移植 (uBMT) を施行後 100 日以上生存し、50 日を越えて経過観察可能であった 280 例 (CBT 群 163 例、uBMT 群 117 例) を後方視的に解析した。

3. T 細胞活性化培養法

臍帯血は東京臍帯血バンクより供給を受けた。無血清培養液或いは 2~5% ヒト血清 (時に 10% 牛胎児血清 (FBS)) を添加した AIM-V 等のリンパ球様培養液に IL-2 を添加し、OKT-3 抗体を固相化したフラスコを用いて培

養した。

4. 制御性 T 細胞 (Treg) の増幅培養法

抗 CD3/CD28 抗体を固相化したプラスチックと、IL-2 および TGF- β を添加した培養液を用いる基本プロトコルを用い、mammalian target of Rapamycin (mTOR) 阻害薬である Everolimus と Rapamycin を添加して培養した。

5. EB ウイルス関連リンパ増殖性疾患モデルマウスによる臍帯血活性化 DLI の前臨床研究

NOG マウスに臍帯血造血幹細胞を移植しヒト免疫系細胞を再構築した後、Akata 株 EB ウイルス (EBV) を尾静脈より接種した。EBV 感染を確認した後、ヒト化に用いた臍帯血から、実際の治療に用いるものと同じ方法で調製した臍帯血活性化 T 細胞を、数段階の用量により静脈内投与した。

6. マルチカラーフローサイトメトリー

FITC、PE、ECD、PC5.5、PC7、APC、APC-Alexa-700 (Alexa-700)、APC-Alexa-750 (APC-Cy7)、Pacific-Blue、KromeOrange (Cascade-Yellow) の 10 種類の異なる蛍光色素で標識した単クローン性抗体のセットによる蛍光染色を行い、Digital flow cytometry Galios (Beckman-Coulter 社) を用いて 3 レーザー 10 カラー解析を行った。

7. 臍帯血 DLI 臨床試験のプロトコル策定

日本臨床研究支援ユニット (J-CRSU) に一部の作業を委託した。

(倫理面への配慮)

本研究は直接ヒトを対象とする医療行為を含まないが、ヒト臍帯血細胞を利用するため、ヘルシンキ宣言に則った倫理的配慮を必要とする。臍帯血バンクに提供された臍帯血には、血液量不足などの理由により移植に用いることができないものが一定の割合で含まれ、多くは廃棄されている。本研究はこのような臍帯血を利用するものであり、提供者に不利益は生じない。バンクへの臍帯血提供の際には、移植に使用できない場合は研究に利用する旨を説明し同意を得ている。また、臍帯血バンクより提供を受ける際には、連結不可能匿名化を行い、個人情報保護を徹底した。動物実験においては、動物実験指針を遵守し、動物愛護の観点から十分な配慮をした。本研究は国立成育医療センターおよび東京臍帯血バ

ンク倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. 臍帯血移植後の生着不全の成因に関する研究

生着不全症例は、経過中一度も白血球数が 100 を超えない群 (グループ 1) と一時的に 100 を超えたにも関わらず生着しない群 (グループ 2) の二つに分かれた。グループ 1 は主に移植片拒絶によるものと考えられた。一方グループ 2 では、ドナー由来の細胞による免疫介在性の造血障害が関与している可能性が示唆された。

2. 骨髄ストローマ細胞機能の放射線による障害と脱分化脂肪細胞 (DFAT) による回復

HES5-5 細胞に 1Gy 以上の放射線を照射した後 RT-PCR 法及び ELISA 法で測定したところ、幹細胞維持因子 SDF-1 の発現が有意に低下していた。また、マウス個体に 10 Gy 以上の放射線を照射すると、大腿骨及び頸骨の骨髄ストローマ細胞数が 1/10 以下に低下すると同時に、大腿骨骨髄組織の免疫染色において、SDF-1 陽性領域の面積が有意に減少し、アポトーシス細胞が増加した。放射線照射したマウスに DFAT を投与すると、対照と比較して有意に造血幹細胞が増加した。さらに、NOD/scid マウスに臍帯血造血幹細胞を移植する際に DFAT を同時に移植すると、生着が促進され造血作用が早期に回復した。

3. 臍帯血移植および非血縁者間骨髄移植後中後期におけるウイルス感染症の検討

移植後中後期のウイルス感染症の発症率は CBT 群で高いが、致死的状态へ進展の可能性は CBT と uBMT の両群でほぼ同等であり、移植ソースにかかわらず重篤な移植片対宿主病 (GVHD) 合併例や高用量ステロイド使用例で綿密なモニター及び十分な予防対策が必要と考えられた。

4. 臍帯血 CD4⁺ T 細胞の活性化培養とその安全管理に関する検討

1) 無血清培養液の検討

無血清培養液の OpTimizer T Cell Expansion SFM 培地 (invitrogen)、AIM-5 培地 (invitrogen)、KBM540 培地 (コージンバイオ)、ALyS505 培地 (細胞科学研究所)、ALyS705 培地 (細胞科学研究所)、SKY-2 培地 (スカイセルサイエン

ス) をテストしたが、牛胎児血清或いはヒト血清添加培養液に匹敵するものは見つからなかった。さらに、GMP に準拠して生産されている無血清培養液 TexMACS と従来の培養液 AIM-V+2%FBS を詳細に比較したところ、成人末梢血由来単核細胞 (MNC) の場合、後者が細胞増殖の程度と活性化マーカー発現率の点で若干優れていた。新鮮臍帯血由来 MNC では、TexMACS 使用群において、抗 CD3 抗体除去後に死細胞の増加が認められた。さらに、凍結保存臍帯血由来 MNC においては、TexMACS 使用群では細胞増殖と死細胞数の点で、AIM-V+2%FBS と比較して明らかに劣っていた。

2) 培養の諸ステップの改良

臍帯血の希釈や洗浄に 1%アルブミン添加生理食塩水 (医薬品グレード) を導入した。ヒト血清に代えて牛胎児血清を用いる培養法を確立した。また、細胞の凍結に 1%アルブミン添加生理食塩水 (医薬品グレード) を用いる方法を検討した。

4) 臍帯血 DLI 安全管理法の確立

これまでに開発してきた多種ウイルス同時迅速検出システムに、A 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 及び 2 型、ヒト免疫不全症ウイルス 1 及び 2 型の計 6 種のウイルスが新たな検査項目として加えられた。

5. 制御性 T 細胞 (Treg) の増幅培養

基本培養プロトコールに Rapamycin を添加すると、CD25⁺FOXP3⁺率は上昇したが、増殖抑制作用があるため Treg 数としては改善されなかった。一方 Everolimus を添加すると、10 nM の濃度で細胞数と CD25⁺FOXP3⁺率の両者が上昇したため Treg の収量も増加した。

6. マルチカラーフローサイトメトリーによる T 細胞サブセット解析

CD3、CD4、CD8、CD27、CD45RA、CD45RO、CD62L、CD244 を組み合わせ、さらに NK 細胞検出用に CD56 を加えたパネルを用いた解析法を確立し、1 本のチューブで詳細な末梢血リンパ球サブセット解析が可能となった。これにより、少量のサンプル或いは血液を用いて、移植に用いる臍帯血活性化 T 細胞や、臍帯血活性化 DLI 実施後の患者末梢血 T 細胞のサブセット解析を行うことが可能となった。

7. EB ウイルス関連リンパ増殖性疾患モデルマウスによる臍帯血活性化 DLI の前臨床研究

EBV 関連リンパ増殖性疾患を発症しているマウスに対し、①生理食塩水、②臍帯血活性化全 T 細胞、或いは③臍帯血活性化 CD4⁺T 細胞を輸注したところ、個体数は限られているものの、全 T 細胞を輸注した群で生存期間が延長し臓器における EBV DNA 量が低下することが示唆された。同様に感染マウスに臍帯血由来活性化 T 細胞を投与した後定期的に採血し、フローサイトメトリーによりリンパ球サブセットを解析したところ、活性化 T 細胞を投与した後、末梢血 EBV DNA レベルが低下すると同時に、HLA-DR 陽性の活性化 CD8⁺T 細胞が急激に増加することがわかった。この結果から、臍帯血活性化 DLI が奏功する際のメカニズムとして、細胞傷害性 T 細胞の誘導が考えられた。

ヒト化マウスを用いた EBV 感染モデルにおいて以下の点を明らかにした。①EBV 感染マウスには、EBV 特異的な T 細胞免疫応答が惹起されること (ELISPOT 法および cytokine flow cytometry 法) (図 5, 6)、②T 細胞応答が EBV 感染に対する防御機構として機能すること (T 細胞除去実験および Transformation regression assay)。また、EBV 感染直後に自然免疫応答が誘導されることが示唆された。

8. 臍帯血 DLI 臨床試験

「ハイリスク臍帯血移植患者に対する臍帯血活性化 DLI に関する臨床第 I 相試験実施計画書」を作成した。目的：ハイリスク臍帯血移植における移植後の諸問題 (白血病再発、混合キメラ、感染症など) に対する治療としての臍帯血活性化 DLI 療法の妥当性、安全性及び臨床効果を評価すること。対象患者：臍帯血移植後に再発、混合キメラとなった血液疾患患者。主たる評価項目：安全性 (輸注に伴う有害事象の発現数及び程度); 臍帯血活性化 T 細胞輸注後 30 日までの有害事象の種類、Grade (NCI-CTC ver4.0)、発現頻度、及び有害事象発現までの期間。予定登録数と症例登録期間：予定培養登録数、30 例; 予定治療登録数、12 例; 症例登録期間、1 年; 追跡期間、最終症例の移植後 1 年。

D. 考察

臍帯血移植では、骨髄移植と異なりストローマ細胞が移植されないことが、生着不全が多い原因の一つとして考えられている。幹細胞維持因子 SDF-1 を産生する DFAT を臍帯血移植と同時移植に移植することにより生着不全を予防することが可能であると考えられた。

臍帯血からの Treg 調製については、従来の基本培養プロトコールに mTOR 阻害薬 Everolimus を添加することにより、純度の高い Treg をより効率的に調製することが可能となった。これにより今後の研究が進展すると考えられる。

臍帯血 DLI の作用メカニズムはこれまで全く不明であったが、本研究により少なくとも EBV 関連リンパ増殖性疾患に対しては、細胞傷害性 T 細胞が最終的なエフェクターであることが示唆された。臍帯血活性化 DLI に用いる細胞は無血清培養液で培養することが望まれるが、現時点ではヒト血清或いは牛胎児血清を添加した培養液と同程度に細胞増殖と活性化を支持する製品を見いだされていない。今後も探索が必要であると考えられた。予定している臨床第 I 相試験においてはヒト血清或いは牛胎児血清を用いる予定である。また、培養に付随する様々なステップにおいて医薬品グレードの試薬を導入したことにより安全性が向上したと考えられる。マルチカラーフローサイトメリーの導入によって、臍帯血活性化 DLI に用いる細胞の性状解析や同治療施行後の患者末梢血におけるリンパ球解析を、少量の血液を用いて迅速に行うことが可能になっている。本研究でほぼ完成した「ハイリスク臍帯血移植患者に対する臍帯血活性化 DLI に関する臨床第 I 相試験実施計画書」にそって今後すみやかに臨床試験に進む予定である。

E. 結論

臍帯血活性化 DLI に関して、安全管理法の確立を含めた基盤整備とマウスモデルによる前臨床研究を行った。さらに「ハイリスク臍帯血移植患者に対する臍帯血活性化 DLI に関する臨床第 I 相試験実施計画書」を策定し、臨床試験実施の準備を完了した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, and Fujiwara S. Novel Mouse Xenograft Models Reveal a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells. PLoS Pathogens, 7(10): e1002326, 2011.
- 5) Morio T. Atsuta Y. Tomizawa D. Nagamura-Inoue T. Kato K. Ariga T. Kawa K. Koike K. Tauchi H. Kajiwara M. Hara T. Kato S.: Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88 patients with primary immunodeficiency in Japan. Br. J. Haematol. 154:363-372, 2011.
- 6) 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;117(11):3240-3242.
- 7) Uchida N, Wake A, Nakano N, Ishiwata K, Takagi S, Tsuji M, Yamamoto H, Kato D, Matsuno N, Masuoka K, Araoka H, Asano-Mori Y, Izutsu K, Makino S, Yoneyama A, Taniguchi S. Mycophenolate and tacrolimus for graft-versus-host disease prophylaxis for elderly after cord blood transplantation: a matched pair comparison with tacrolimus alone. Transplantation. 2011;92(3):366-371.
- 8) 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. 2011;46(4):619-620.
- 10) Tanosaki R., Muroi K., Nagamura-Inoue T., Ishida A., Mizuta S., Maekawa T., Ito T., Kishino K., Uemura T., Takahashi AT., Ohto H. for the Cell Processing Guideline Working Group of the Japan Society of Transfusion Medicine and Cell

Therapy (JSTMCT). Guideline for processing cellular therapy products routinely used for hematopoietic stem cell transplantation in Japan. The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy.(日本輸血・細胞治療学会誌(報告)), 57,184-187, 2011

11) Atsuta Y, Morishima Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T, Taniguchi S, Takahashi S, Kai S, Sakamaki H, Kouzai Y, Kobayashi N, Fukuda T, Azuma H, Takanashi M, Mori T, Tsuchida M, Kawase T, Kawa K, Kodera Y, Kato S. Comparison of unrelated cord blood transplantation and HLA-mismatched unrelated bone marrow transplantation for adults with leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Oct 15. [Epub ahead of print]

13) Miki Yuzawa, Nagamura-Inoue T, Ikuo Ishige, Kazuo Ogami, Tomoki Tamura, Atsuko Takahashi, Hideki Kodo, Satoru Yamaguchi, and Arinobu Tojo, Time from cord blood collection to processing and temperature influence the quality of mononuclear cell products isolated using a density-gradient protocol., *The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy*.(日本輸血・細胞治療学会誌), 57,139-145, 2011

8) Hishizawa M, Kanda J, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells for adult T-cell leukemia: a nationwide retrospective study. *Blood*. 116,1369-76, 2010.

9) Isoyama K, Oda M, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kai S, Kigasawa H, Kobayashi R, Mimaya J, Inoue M, Kikuchi A, Kato S; Japan Cord Blood Bank Network. Long-term outcome of cord blood transplantation from unrelated donors as an initial transplantation procedure for children with AML in Japan. *Bone Marrow Transplant*. 45:69-77, 2010.

10) Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Ogawa M, Sugimoto Y and

Mochizuki M. Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative PCR. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95:345-349.

2. 学会発表

1) Ohta H, Taniguchi S et al. Possible Two Different Mechanisms of Engraftment Failure in Cord Blood Transplantation: Graft Rejection and Poor Graft Function. 2011 Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2011/12/10-12, San Diego, USA

2) Ikebe T, Taniguchi S et al. Prospective Weekly Multiple Viral Monitoring in Blood Using Multiplex PCR Assay Early After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 2011 Annual Meeting of the American Society of Hema

7) Tokiko Nagamura-Inoue¹, Seiichiro Kobayashi², Kazuo Ogami¹, Yuki Yamamoto¹, Kiyoko Izawa², and Arinobu Tojo¹, 2 The Significance of mTOR Inhibitor, Everolimus in TGF- β -Induced Regulatory T cells from Cord Blood., 2180, American Society of Hematology Annual meeting, San Diego Convention Center, USA, Dec. 11, 2011

3) Morio T, Tomizawa D, Atsuta Y, Nagamura T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara S, and Kato S. Unrelated umbilical cord blood transplantation for patients with primary immunodeficiency in Japan. The 52nd ASH Annual Meeting. Orlando, Florida, USA. December 2010.

4) Morio T, Tomizawa D, Atsuta Y, Nagamura T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara S, and Kato S. Unrelated umbilical cord blood transplantation for patients with primary immunodeficiency in Japan. XIVth meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Istanbul, Republic of Turkey. October 2010.

6) Morio T. Immunomonitoring and T-cell immunotherapy in CBT. The Second Korea-Japan Cord Blood Transplantation Symposium. Yokohama in Japan. September 2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし。

臍帯血リンパ球を主成分とする細胞治療製剤の 医薬品化に関する研究

所属 国立成育医療研究センター研究所 母児感染研究部
研究者 藤原成悦

研究要旨 臍帯血 DLI に用いる活性化 T 細胞など、臍帯血リンパ球を主成分とする細胞治療製剤の医薬品化に向けて、GMP に則った培養法の確立、制御性 T 細胞調製法の改良、臍帯血 DLI の前臨床研究、臍帯血 DLI 臨床第 I 相試験プロトコルの策定などを行った。

分担研究者

- (1) 東京医科歯科大学難治疾患研究所 清水 則夫
- (2) 東京医科歯科大学大学院 森尾友宏
- (3) 国立成育医療研究センター研究所 清河 信敬
- (4) 日本大学医学部 麦島秀雄
- (5) 株式会社リンフォテック 茅野真一
- (6) 虎ノ門病院 谷口修一
- (7) 神鋼病院 伊藤仁也
- (8) 東京大学医科学研究所 長村登紀子

A. 研究目的

臍帯血移植後のドナーリンパ球輸注療法を実現するために、ごく少量の臍帯血から、固相化抗 CD3 抗体と IL-2 を添加した培養により、2 週間で 10^{8-9} オーダーの活性化 T 細胞を調製しうる方法を、これまでに確立してきた。探索的臨床研究では、臍帯血移植後のサイトメガロウイルス日和見感染、コクサッキーウイルス腸炎、混合キメラ状態などの治療に有効であることが示唆された。また、移植片対宿主病 (GVHD) の治療を目的として、末梢血及び臍帯血より高純度の制御性 T 細胞 (Treg) を調製するプロトコルを確立し、マウスにおける前臨床研究によりその GVHD に対する有効性を確認している。さらに、ウイルス特異的 T 細胞を調製し、これを治療に用いるための基礎研究を行ってきた。本研究では、これらの研究をさらに進め、臍帯血リ

ンパ球から、臍帯血 DLI に用いる活性化 T 細胞、GVHD 治療に用いる Treg 細胞、感染症の治療に用いるウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞などを Good Manufacturing Practice (GMP) 基準に則ったプロトコルにより調製するシステムの確立を図る。また、臍帯血 DLI に関しては、マウスを用いた前臨床研究を再度行った上で、第 I 相臨床試験を行い、安全性と有効性を検証する。本年度は、主に臍帯血 DLI に焦点を当て、GMP 基準に則した培養プロトコルの確立、マルチカラーフローサイトメトリーによる活性化臍帯血 T 細胞のマーカー発現の解析、臍帯血からの Treg 細胞調製法の改良、ヒト化マウスを用いた前臨床研究、第 I 相臨床試験プロトコルの策定を行った。また、臍帯血移植で生着不全が多いことの原因解明とその対策に関する研究を行った。

B. 研究方法

1. 臍帯血移植後の生着不全の成因に関する研究

2002 年 1 月から 2011 年 5 月までに、虎の門病院で施行した臍帯血移植 458 例を対象として、移植後 28 日以内の早期死亡(52 例)や再発(15 例)を除いた 383 例のうち、生着不全の定義を満たした 35 例を対象とした。

2. 骨髄ストローマ細胞に対する放射線障害の解析

マウス骨髄ストローマ細胞 HESS-5 に対し放射線照射 (0.1, 0.5, 1, 10, 20Gy) を行い、48

時間後培養後、上清または接着細胞を回収し ELISA または RT-PCR により幹細胞維持因子 SDF-1 の発現を検討した。また、C57BL/6 マウスに放射線照射 (1, 10Gy) を行ない、48 時間後に大腿骨および脛骨を摘出した。これより骨髓ストローマ分画 (CD45-TER119-細胞) を磁気ビーズ法にて採取し、細胞数を計測した。さらに、10Gy 照射マウスの大腿骨非脱灰切片標本を用い、SDF-1 に対する蛍光免疫染色を行ない、骨髓組織中の SDF-1 陽性領域の大きさを測定した。

3. 骨髓障害モデルマウスに対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 移植

C57BL/6 マウスに放射線照射 (7 Gy) を行った後、脱分化脂肪細胞 (DFAT) 5×10^5 個 (DFAT 群) または生理食塩水 (コントロール群) を尾静脈より 3 日間投与した。投与開始日から 14、21 日後に大腿骨および脛骨より骨髓細胞を採取し、造血幹細胞分画 (Lin-c-kit+Sca-1+) の割合をフローサイトメーターにより解析した。

4. ヒト臍帯血移植モデルマウス

NOD/SCID マウスに放射線照射 (3 Gy) を行った後 2 群に分け、照射 24 時間後にコントロール群にはヒト臍帯血 CD34⁺細胞 (1×10^4) を、DFAT 群にはヒト臍帯血 CD34⁺細胞 (1×10^4) 及び DFAT (5×10^5) を尾静脈より投与した。

5. GMP に準拠した臍帯血 T 細胞活性化培養法の確立

臍帯血は、東京臍帯血バンクから移植に使用できなかったものの提供を受けて研究に用いた。臍帯血から単核細胞を比重遠心法により分離し、固相化抗 CD3 抗体と IL-2 (350 IU/ml) を添加し約 2 週間培養する基本プロトコルに従い、GMP 準拠で製造されている無血清培養液 TexMACS (Miltenyi Biotec 社) とこれまで使用してきた米国 FDA 認可の培養液 AIM-V に 2% 牛胎児血清を加えたもの (AIM-V+2% FBS) を比較した。

6. マルチカラーフローサイトメトリーによる活性化臍帯血 T 細胞のマーカー発現解析

FITC、PE、ECD、PC5.5、PC7、APC、APC-Alexa-700 (Alexa-700)、APC-Alexa-750 (APC-Cy7)、Pacific-Blue、KromeOrange (Cascade-Yellow) の 10 種類の異なる蛍光色素で標識した単クローン性抗体のセットによる蛍光染色を行い、Beckman-Coulter 社 Galios

を用いて 3 レーザー 10 カラー解析を行った。

7. 臍帯血制御性 T 細胞 (Treg) の体外増幅法
固相化抗 CD3/CD28 抗体で刺激した臍帯血 CD4⁺T 細胞を 5%FBS+IL2+TGF β 存在下で、mammalian target of Rapamycin (mTOR) 阻害薬である Rapamycin および Everolimus 添加にて 2 週間培養した。培養前後の CD25⁺FOXP3⁺Treg% および増幅効率を算出した。制御性 T 細胞 (Treg) の *in vitro* 機能の評価は CFSE 染色を併用した混合リンパ球反応を用いた。

8. EB ウイルス感染モデルマウスにおける臍帯血 DLI の前臨床研究

NOG マウスに臍帯血造血幹細胞を移植し、免疫ヒト化マウスを作成した。このマウスに Akata 株の EB ウイルス (EBV) を尾静脈より接種した。臍帯血 DLI には、対象マウスをヒト化するのに用いた臍帯血から autologous な T 細胞を活性化培養して用いた。臍帯血からリンフォセパールを用いた比重遠心法により単核細胞を分離し、RPMI-1640 培養液 (10% ヒト血清、rIL-2 700 IU 添加) に浮遊させ、抗 CD3 抗体を固相化したフラスコを用い、CO₂ インキュベーター (37°C \pm 0.5°C、CO₂ 濃度 5.0 \pm 0.2%、湿度 95% \pm 5%) で静置培養した。CD4 陽性 T 細胞の分離は、培養 5~7 日目に磁気ビーズを用いて行った。ヒト化マウスへの EBV 感染を確認した後、体重 (kg) あたり約 5.0×10^6 cells の活性化臍帯血 T 細胞を、1 週間隔で 3 回、尾静脈から投与した。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言に則った倫理的配慮を必要とする。臍帯血バンクに提供された臍帯血には、血液量不足などの理由により移植に用いることができないものが一定の割合で含まれ、多くは廃棄されている。本研究はこのような臍帯血を利用するものであり、提供者に不利益は生じない。バンクへの臍帯血提供の際には、移植に使用できない場合は研究に利用する旨を説明し同意を得ている。また、臍帯血バンクより提供を受ける際には、連結不可能匿名化されるため、個人情報保護は徹底されている。探索的臨床研究における治療に際しては、十分な説明を行った上で同意を得た。今後施設共同臨床研究を行う際には、各種臨床研究指針に則り、全施設での

倫理審査委員会の承認を得た後研究を開始する。動物実験においては、動物実験指針を遵守し、動物愛護の観点から十分な配慮をした。本研究は国立成育医療研究センターおよび東京脐帯血バンク倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. 脐帯血移植後の生着不全の成因に関する研究

生着不全時の白血球数の推移には経過中一度も白血球数が 100 を超えない群(グループ 1)と一時的に 100 を超えたにも関わらず生着しない(グループ 2)の 2 群に分かれた(図 1)。グループ 1 はドナー型キメラの頻度が有意に低く、主に移植片拒絶によるものと考えられた。一方グループ 2 では、ドナー型キメラ 50% 以上に達していた症例が有意に高く、このグループでは、ドナー由来の細胞による免疫介在性の造血障害が関与している可能性が示唆された(図 2)。

2. 骨髄ストローマ細胞に対する放射線障害の解析

HESS-5 細胞の SDF-1 RNA 発現は、1Gy 以上の放射線により有意に低下した ($p < 0.01$)。また、マウス個体に対して 10 Gy 異常の照射すると、骨髄ストローマ細胞数が 1/10 以下に低下した。さらに免疫染色を行うと、照射により大腿骨骨髄組織中の SDF-1 陽性領域は有意に縮小し ($p < 0.05$) (図 3A)、アポトーシス細胞が増加した。

3. 骨髄障害モデルマウスに対する DFAT 移植の効果

DFAT 投与開始から 14 日後の造血幹細胞分画の割合は、DFAT 群とコントロール群ともに 0.001% と低く、両群間に有意差は認められなかった。投与開始から 21 日後には、コントロール群は 14 日後と変化がなかったが、DFAT 群では、造血幹細胞分画の出現が認められるようになり (0.053%)、コントロール群に比べて有意に増加していた ($p < 0.01$) (図 3B)。

4. 脐帯血移植に対する DFAT の効果

移植 4 週間後では DFAT 群、コントロール群ともに末梢血中にヒト CD45+細胞はほとんど検出されなかったが、12 週間後には DFAT 群では末梢血中の約 1.3% と有意に高く ($p <$

0.05) ヒト hCD45+細胞が検出されるようになった(図 4A)。さらに、12 週後の骨髄中のヒト CD45+細胞の割合は、末梢血の結果と同様に、コントロール群に比べ DFAT 投与群で有意 ($p < 0.05$) に高値を示した(図 4B)。

5. GMP (Good manufacturing practice) に準拠した脐帯血 T 細胞活性化培養法の確立

成人末梢血、新鮮脐帯血、凍結保存脐帯血の 3 者から分離した単核細胞 (MNC) を用いて、TexMACS と AIM-V+2%FBS を比較した。成人末梢血由来 MNC の場合、両者の違いはわずかであった。新鮮脐帯血由来 MNC では、TexMACS 使用群において、抗 CD3 抗体除去後に死細胞の増加が認められた。さらに、凍結保存脐帯血由来 MNC においては、TexMACS 使用群では細胞増殖と死細胞数の点で、AIM-V+2%FBS と比較して明らかに劣っていた。

6. 脐帯血 DLI 安全管理法の確立

今年度は、これまでに開発してきた多種ウイルス同時迅速検出システムに、A 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 及び 2 型、ヒト免疫不全症ウイルス 1 及び 2 型の計 6 種類を新たに検査項目に加えることに成功した。

7. マルチカラーフローサイトメトリーによる活性化脐帯血 T 細胞のマーカー発現の解析

まず T 細胞をゲーティングするための抗 CD3 抗体を標識する蛍光色素として、PC7、APC-Alexa-700 などが適切であるという結果を得た。これにもとづき、詳細な T 細胞サブセットを検出するために、CD4、CD8 に加えて、CD27、CD45RA、CD45RO、CD62L、CD244 を組み合わせ、NK 細胞検出用に CD56 を加えた、パネルを決定した(図 5)。このパネルを用いた実際の測定例(健康人末梢血)を図 6 に示す。このパネルを用いることによって、1 本のチューブの測定で、詳細な末梢血リンパ球サブセット解析が可能となった。すなわち、少量のサンプル或いは血液を用いて、移植に用いる活性化脐帯血 T 細胞や、脐帯血 DLI 実施後の患者末梢血 T 細胞のサブセット解析を行うことが可能となった。

8. 脐帯血 Treg 細胞の体外増幅法の改良

Rapamycin を添加すると、CD25+FOXP3+率は上昇したが、増殖抑制作用があるため Treg

数としては改善されなかった。一方 Everolimus を添加すると、10 nM の濃度で細胞数と CD25⁺FOXP3⁺率の両者が上昇したため Treg の収量も増加した。

9. EB ウイルス感染モデルマウスに対する臍帯血 DLI の効果

EBV を接種したヒト化マウスに臍帯血活性化 T 細胞を 1 週間間隔で 3 回投与した。活性化 T 細胞としては CD4⁺ T 細胞のみを分離したものと、活性化全 T 細胞の二種類を用いた。以下にそれぞれの代表的な結果を示す。

1) 活性化全 T 細胞を投与した場合

臍帯血 DLI 開始の時点で末梢血 EBV DNA 量は 3.4×10^3 copies/ μ g DNA であった。1 週間後には一旦検出感度以下まで低下し、2 週間後には 2.2×10^2 copies/ μ g DNA まで上昇したが、3 週間後以降は検出感度以下に保たれている。CD8⁺ T 細胞および HLA-DR⁺ 活性化 CD8⁺ T 細胞は初回 DLI から 2 週間後に急激に上昇し、その後は 5 週間後にかけて減少した。一方 CD4⁺ T 細胞及び HLA-DR⁺ 活性化 CD4⁺ T 細胞は初回 DLI 後 2~4 週間後にかけて、軽微な上昇を示した。本マウスにおいては、臍帯血 DLI 施行後、活性化 CD8⁺ T 細胞の上昇と同時に末梢 EBV DNA 量が減少したため、臍帯血 DLI により EBV 感染細胞の増殖が抑制されるときの最終的な effector 細胞が細胞傷害性 T 細胞であることが示唆された。

2) 活性化 CD4⁺ T 細胞を選択して投与した場合

臍帯血 DLI 開始の時点では、末梢血 EBV DNA 量は 3.5×10^4 copies/ μ g DNA であった。1 週間後 3.7×10^4 copies/ μ g DNA まで微増した後、4 週間後以降は検出感度以下まで低下した。CD8⁺ T 細胞は DLI 開始後 1~3 週間後にかけて徐々に増加し、特に HLA-DR⁺ の活性化 CD8⁺ T 細胞は臍帯血 DLI 開始後 2 週間をピークとして急激に上昇した。一方 CD4⁺ T 及び HLA-DR⁺ の活性化 CD4⁺ T 細胞は、臍帯血 DLI 開始後 1~4 週間後にかけてやや増加した。このマウスにおいても、末梢血 EBV DNA 量の減少に一致して活性化 CD8⁺ T 細胞が増加したので、effector 細胞は細胞傷害性 T 細胞であることが示唆された。

10. 臍帯血 DLI 第 I 相臨床試験のプロトコ

ルの策定

日本臨床研究支援ユニットに一部の作業を委託して、「ハイリスク臍帯血移植患者に対する臍帯血活性化 DLI に関する臨床第 I 相試験実施計画書」を作成した。目的：ハイリスク臍帯血移植における移植後の諸問題（白血病再発、混合キメラ、感染症など）に対する治療としての臍帯血活性化 DLI 療法の妥当性、安全性及び臨床効果を評価すること。対象患者：臍帯血移植後に再発、混合キメラとなった血液疾患患者。主たる評価項目：安全性（輸注に伴う有害事象の発現数及び程度）；臍帯血活性化 T 細胞輸注後 30 日までの有害事象の種類、Grade(NCI-CTC ver4.0)、発現頻度、及び有害事象発現までの期間。予定登録数と症例登録期間：予定培養登録数、30 例；予定治療登録数、12 例；症例登録期間、1 年；追跡期間、最終症例の移植後 1 年。

D. 考察

1. 臍帯血移植後の生着不全の成因に関する研究

臍帯血移植における生着不全には、異なる二つの機序が関わる可能性が考えられた。一つは graft rejection type で、白血球数が一貫して低値であり、その原因として DSA の存在、レシピエント型リンパ球の残存の影響が示唆された。もう一つは poor graft function type で、ドナー優位の白血球数の一過性の上昇がみられるものの、PIR や HPS といった高サイトカイン血症を伴い生着不全に至るものであった。後者は臍帯血移植に特有の現象と考えられた。

2. 放射線による骨髄ストローマ細胞障害と DFAT による回復について

造血幹細胞移植前の放射線照射などにより骨髄ストローマ細胞の幹細胞維持機能が障害されると考えられるが、臍帯血移植では骨髄移植と異なり、骨髄ストローマ細胞が造血幹細胞と一緒に移植されない。このことが臍帯血移植では生着不全が多いことの一因となっていると考えられる。DFAT はマウス成熟脂肪細胞を脱分化して得られた間葉系幹細胞類似細胞で、幹細胞維持因子 SDF-1 を高発現している。ヒト臍帯血と DFAT の同時移植はヒト臍帯血の生着を促進し、造血作用が早期に回復すると考えられる。

3. 臍帯血 T 細胞活性化培養法の GMP に則った改良

GMP に準拠して製造されている TexMACS 培養液は、臍帯血、特に臍帯血 DLI で使用される凍結保存臍帯血からの活性化 T 細胞培養においては、従来の AIM-V+2%FBS と比較して明らかに劣っていることが分かったため、今後しばらくは AIM-V+2%FBS 或いは AIM-V+2%ヒト血清を用いる必要があると考えられた。成人末梢血由来 MNC と比べて、臍帯血由来 MNC は血清依存性が高いと考えられた。

4. 臍帯血 Treg 細胞の体外増幅法の確立について

固相化抗 CD3/CD28 抗体および TGF- β を用いた基本的増幅系はすでに確立されているが、本年度は mTOR 阻害剤である Everolimus を添加することにより Treg マーカーである FOXP3 の安定的発現を実現することができたため、安定した品質の Treg 細胞を調整することが可能となった。

5. EBV 感染モデルマウスに対する臍帯血 DLI の効果について

ヒト化マウスを用いたこれまでの前臨床研究により、臍帯血 DLI の EBV-LPD に対する効果（延命効果及び EBV DNA 量減少効果）を示唆するデータが積み重ねられてきた。しかし、臍帯血 DLI の作用メカニズムについては不明であった。今回の解析から、臍帯血 DLI 施行後の末梢血 EBV DNA 量低下と同時に末梢血 CD8+ T 細胞、特に HLA-DR+ の活性化 CD8+ T 細胞の増加が認められたことから、臍帯血 DLI の最終的な effector は細胞傷害性 T 細胞であることが示唆された。今回の実験では、全活性化 T 細胞を投与する実験と、活性化 CD4+ T 細胞のみを選択的に投与する実験の両者を行ったが、両者において、活性化 CD8+ T 細胞が上昇したことから、CD4+ T 細胞による DLI の場合も最終的な effector は活性化 CD8+ T 細胞であることが示唆された。

6. 臍帯血活性化 DLI 第 I 相臨床試験の実施について

臨床試験の実施に当たっては、日本臨床研究支援ユニットにデータセンター機能等を委託することにより、円滑な運営を行う計画である。

E. 結論

臍帯血 DLI に用いる活性化 T 細胞など、臍帯血リンパ球を主成分とする細胞治療製剤の医薬品化に向けて、GMP に則った培養法の確立、制御性 T 細胞調製法の改良、臍帯血 DLI の前臨床試験、臍帯血 DLI 臨床第 I 相試験プロトコールの策定を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, and Fujiwara S. Novel Mouse Xenograft Models Reveal a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells. *PLoS Pathogens*, 7(10): e1002326, 2011.

2) Kuwana Y, Takei M, Yajima M, Imadome K, Inomata H, Shiozaki M, Ikumi N, Nozaki T, Shiraiwa H, Kitamura N, Takeuchi J, Sawada S, Yamamoto N, Shimizu N, Ito M, and Fujiwara S. Epstein-Barr Virus Induces Erosive Arthritis in Humanized Mice. *PLoS ONE*, 6(10): e26630, 2011.

3) Daichi Inoue, Kyoko Maruyama, Seiji Nagano, Yoko Takiuchi, Hiroshi Arima, Takaharu Kimura, Sonoko Shimoji, Minako Mori, Sumie Tabata, Soshi Yanagita, Akiko Matsushita, Kenichi Nagai, Hayato Maruoka, Yukihiko Imai, Kiminari Ito, Takayuki Takahashi: Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm that Expresses CD13 Myeloid Antigen. *Acta Haematol*, 126:122-128, 2011.

4) Kato K. Kojima Y. Kobayashi C. Mitsui K. Nakajima-Yamaguchi R. Kudo K. Yanai T. Yoshimi A. Nakao T. Morio T, Kasahara M. Koike K. Tsuchida M. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic granulomatous disease with inflammatory complications and severe infection. *Int J Hematol*.94:479-82, 2011.

5) Morio T. Atsuta Y. Tomizawa D. Nagamura-Inoue T. Kato K. Ariga T. Kawa K. Koike K. Tauchi H. Kajiwarara M. Hara T. Kato

- S.: Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88 patients with primary immunodeficiency in Japan. *Br. J. Haematol.* 154:363-372, 2011.
- 6) 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;117(11):3240-3242.
- 7) Uchida N, Wake A, Nakano N, Ishiwata K, Takagi S, Tsuji M, Yamamoto H, Kato D, Matsuno N, Masuoka K, Araoka H, Asano-Mori Y, Izutsu K, Makino S, Yoneyama A, Taniguchi S. Mycophenolate and tacrolimus for graft-versus-host disease prophylaxis for elderly after cord blood transplantation: a matched pair comparison with tacrolimus alone. *Transplantation.* 2011;92(3):366-371.
- 8) 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.* 2011;46(4):619-620.
- 9) Kanda J, Hishizawa M., Utsunomiya A., Shuichi Taniguchi, Tetsuya Eto, Yukiyo Moriuchi, Ryuji Tanosaki, Fumio Kawano, Yasushi Miyazaki, Masato Masuda, Koji Nagafuji, Masamichi Hara, Minoko Takanashi, Shunro Kai, Yoshiko Atsuta, Ritsuro Suzuki, Takakazu Kawase, Keitaro Matsuo, Tokiko Nagamura-Inoue, Shunichi Kato, Hisashi Sakamaki, Yasuo Morishima, Jun Okamura, Tatsuo Ichinohe, and Takashi Uchiyama. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. *Blood* (in press)
- 10) Tanosaki R., Muroi K., Nagamura-Inoue T., Ishida A., Mizuta S., Maekawa T., Ito T., Kishino K., Uemura T., Takahashi AT., Ohta H. for the Cell Processing Guideline Working Group of the Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy (JSTMCT). Guideline for processing cellular therapy products routinely used for hematopoietic stem cell transplantation in Japan. The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy. (日本輸血・細胞治療学会誌(報告)), 57,184-187, 2011
- 11) Atsuta Y, Morishima Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T, Taniguchi S, Takahashi S, Kai S, Sakamaki H, Kouzai Y, Kobayashi N, Fukuda T, Azuma H, Takanashi M, Mori T, Tsuchida M, Kawase T, Kawa K, Kodera Y, Kato S. Comparison of unrelated cord blood transplantation and HLA-mismatched unrelated bone marrow transplantation for adults with leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011 Oct 15. [Epub ahead of print]
- 12) Kato K, Yoshimi A, Ito E, Oki K, Hara J, Nagatoshi Y, Kikuchi A, Kobayashi R, Nagamura-Inoue T, Kai S, Azuma H, Takanashi M, Isoyama K, Kato S; for the Japan Cord Blood Bank Network. Cord Blood Transplantation from Unrelated Donors for Children with Acute Lymphoblastic Leukemia in Japan: The Impact of Methotrexate on Clinical Outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011 May 25. [Epub ahead of print]
- 13) Miki Yuzawa, Nagamura-Inoue T, Ikuo Ishige, Kazuo Ogami, Tomoki Tamura, Atsuko Takahashi, Hideki Kodo, Satoru Yamaguchi, and Arinobu Tojo, Time from cord blood collection to processing and temperature influence the quality of mononuclear cell products isolated using a density-gradient protocol. *The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy.* (日本輸血・細胞治療学会誌), 57,139-145, 2011
2. 学会発表
(国際学会)
- 1) Ohta H, Taniguchi S et al. Possible Two Different Mechanisms of Engraftment Failure in Cord Blood Transplantation: Graft Rejection and Poor Graft Function. 2011 Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2011/12/10-12, San Diego, USA

2) Ikebe T, Taniguchi S et al. Prospective Weekly Multiple Viral Monitoring in Blood Using Multiplex PCR Assay Early After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 2011 Annual Meeting of the American Society of Hema

7) Tokiko Nagamura-Inoue¹, Seiichiro Kobayashi², Kazuo Ogami¹, Yuki Yamamoto¹, Kiyoko Izawa², and Arinobu Tojo^{1, 2} The Significance of mTOR Inhibitor, Everolimus in TGF- β -Induced Regulatory T cells from Cord Blood., 2180, American Society of Hematology Annual meeting, San Diego Convention Center, USA, Dec. 11, 2011

(国内学会)

1) 森尾友宏: 原発性免疫不全症に対する臍帯血ミニ移植後の混合キメリズム解析と免疫的再構築、東京大学医科学研究所共同研究拠点事業 共同研究成果報告会、東京、2012年3月13日

2) 森尾友宏: 原発性免疫不全症候群に対する造血幹細胞移植療法、第3回移植後キメリズム解析研究会、東京、2012年2月2日

3) 森尾友宏: ウイルス特異的T細胞とその維持、第18回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム、埼玉、2011年10月21日

4) 森尾友宏: 免疫細胞療法における指針について、第3回造血器腫瘍免疫療法研究学術集会、大分、2011年8月20日

5) 第72回日本血液学会総会 P-3-36 臍帯血からの制御性T細胞の誘導増幅による免疫抑制療法の開発 2010年10月16日

6) 第73回日本血液学会総会 OS-3-36 臍帯血からの制御性T細胞の誘導増幅による免疫抑制療法の開発 2011年10月16日

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

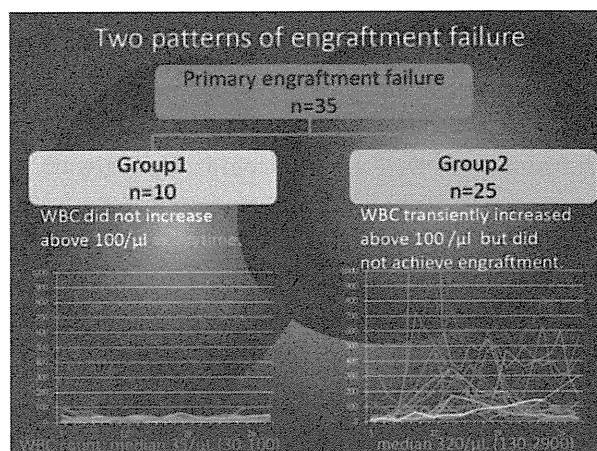


図1. 臍帯血移植後の二つのタイプの生着不全

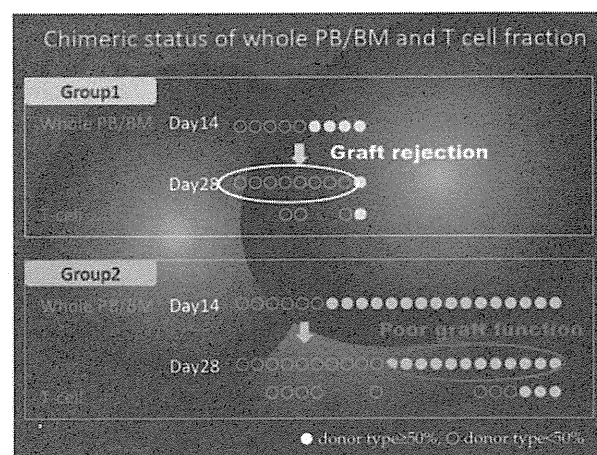


図2. 臍帯血移植後の二つのタイプの生着不全について考えられる成立機序

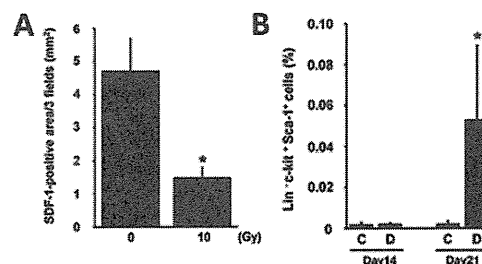


図3 放射線照射が骨髄 SDF-1 発現に与える影響 (A) 及び骨髄傷害モデルマウスの脱分化脂肪細胞 (DFAT) 移植の効果 (B)。C: コントロール群、D: DFAT 群。

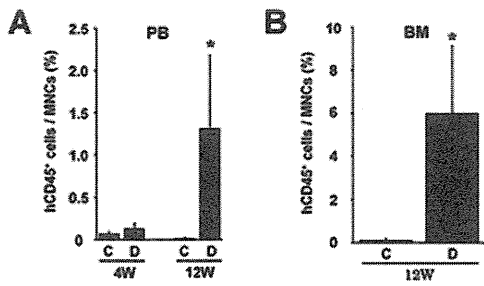


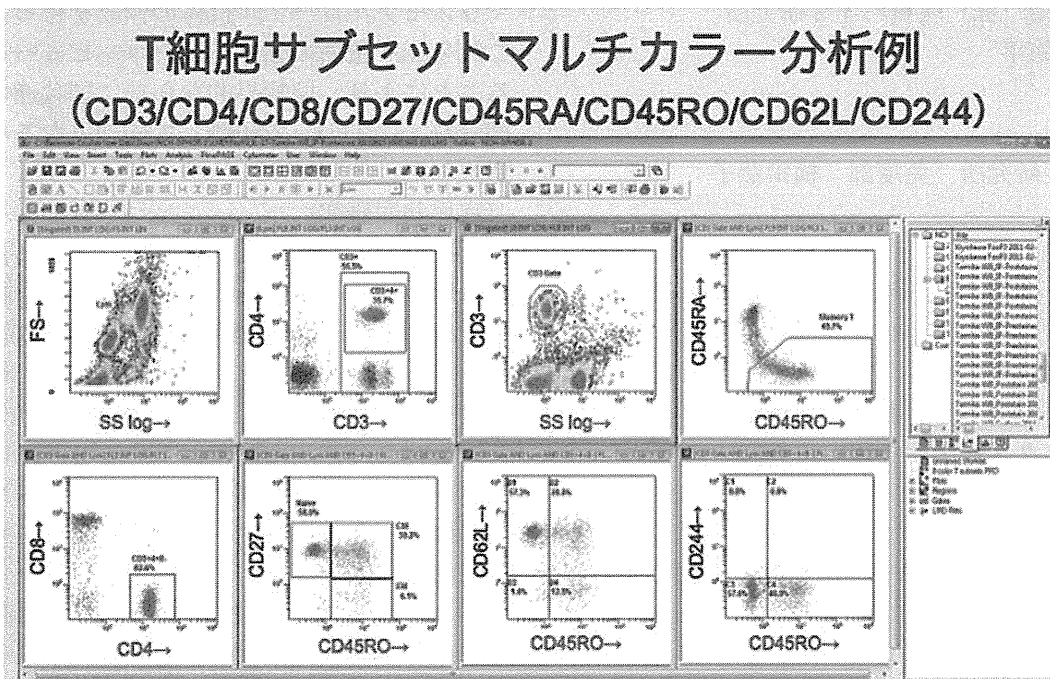
図4 放射線照射ヒト臍帯血造血幹細胞移植モデルマウスに対する DFAT 同時移植の効果。PB:末梢血 (A) 及び BM:骨髄 (B)。C:コントロール群、D:DFAT 群。

図5

臍帯血DLI療法での末梢血免疫機能解析用リンパ球サブセットマルチカラー分析パネル

	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	FL6	FL7	FL8	FL9	FL10	
	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC-Ax700	APC-Ax750	Pacific Blue**	KO	
	NC	NC	CD4	NC	NC	NC	CD8	CD3	NC	-	Gating Control
	CD45RA	NC (IC)	CD4	-	CD27	NC (IC)	CD8	CD3	CD45RO	-	FMO Control
1	CD45RA	CD62L	CD4	CD56	CD27	CD244	CD8	CD3	CD45RO	-	NK 細胞内染色なし*
2	CD45RA	CD62L	CD4	CD56	CD27	CD244	CD8	CD3	CD19	-	NK,B 細胞内染色なし*

図6



インフルエンザウイルス型特異的および共通抗原に対する抗体の作成と迅速診断法の確立

所 属 国立感染症研究所 免疫部
研究代表者 横田 恭子
研究期間 平成 22 年 4 月～平成 24 年 3 月

研究要旨

抗 H5HA 抗体を用いて東洋紡績と共同開発して条件を最適化した H5/AB キットの性能について、ベトナム H5N1 感染者の凍結臨床検体を用いた外部評価を実施した。感度においてはまだ改良の余地があるものの、感染者発生現場での利用価値はあると考えられた。また、本研究でキット作製に用いた抗体の性状に関する論文発表、特許申請を完了し、高感度キット開発に必要な新たな抗体作製のためのエピトープを *in silico* でデザインし、立体的エピトープ解析系を確立した。

研究分担者

- (1) 国立感染症研究所
インフルエンザウイルス研究センター
影山 努
- (2) 国立感染症研究所 免疫部 大西和夫
- (3) 東洋紡績 (株) 敦賀バイオ研究所
三澤 修平

(委託研究)

国立感染症研究所 免疫部 横田恭子

A. 研究目的

東洋紡績(株)が抗体多孔性フィルター固相化と化学発光免疫測定を組み合わせ開発した、抗原を簡便かつ安全に検出するキットとその自動分析装置に、国立感染症研究所が保有あるいは新たにバイオインフォーマティクス的手法を用いて作製する抗体を利用し、インフルエンザウイルス(IV)の型共通あるいは型特異的抗原エピトープを認識判別する、感度と特異性に優れた IV 検出キットの開発を行う。

B. 研究方法

感染研インフルエンザセンターに蓄積された多数のインフルエンザウイルス・ゲノム情報をもとに、これまでに世界中で流行した様々な H5N1 HPAI 株の赤血球凝集素 (hemagglutinin : HA) のアミノ酸配列を

詳細に解析し、H5 亜型に特異的な HA のアミノ酸配列およびエピトープの候補領域を網羅的にリストアップした。その中から立体構造を予測して 3 量体を形成した際に HA の表面に出ている事が予測されるいくつかの領域を選択して、ペプチドを抗原とするマウスモノクローナル抗体の作成を行った。また、これら HA 蛋白の立体構造をコンピューター解析することにより、型特異的ならびに型共通エピトープ部分を *in silico* で予測して候補となるペプチドを選択した。

(官民共同研究)

これまでに確立した H5N1 株に対する多数のモノクローナル抗体の性状解析を行い、最適な組み合わせを見出して H5HA 高感度検出キットを作製した。このキットとインフルエンザ AB 型検出系とセットとして、ベトナム国立衛生試験所 (NIHE) の Dr. Mai らと共同研究を行い、NIHE が保管する H5N1-HPAI 感染者の凍結臨床検体およびそれからのウイルス分離培養液の検出感度をベトナムにおいて評価した。また、様々な HA と GFP を同時に発現するベクターを作製し、293T 細胞で発現させて抗 H5HA 抗体への反応性を比較した。

(倫理面への配慮)

当該施設における倫理委員会や実験動物委員会の承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

H5 亜型で共通のアミノ酸がなるべく多く含まれている部位を選択し、その部位を含むペプチドを合成して、マウスモノクローナル抗体を作製した。様々なペプチドに対してそれぞれ反応する抗体を多数得る事ができたが、ウイルス粒子に対する反応性を持つ抗体は得られなかった。

一方、インフルエンザウイルス・ゲノム配列データベースの構築と解析：感染研インフルエンザセンターのもつデータベースをもとに、ウイルス株間で保存された共通エピトープと型特異的エピトープの候補配列を網羅的に列挙して HA2 分子表面への露出度、エピトープ立体構造の性質などを解析して候補配列を3つの領域に絞り込んだ。更に、予測された3つの候補エピトープ領域について立体構造解析・分子動力学的解析を進め、高感度迅速診断系のため抗原捕捉エピトープと抗原検出エピトープの立体構造干渉の度合いのシミュレーションを行った。

これまでに作製した H5N1 特異的モノクローナル抗体のエピトープ反応性や特異性などの抗体の特徴を明らかにして論文に発表した。更に、これらの抗体を東洋紡績の抗体多孔性フィルター固相化と化学発光免疫測定を組み合わせて開発した、抗原を簡便かつ安全に検出する自動分析装置(POCube)専用のキットを構築し、その特異性や感度を組換え HA 蛋白や不活化ウイルス溶液で評価し、最適化した。

(官民共同研究)この H5HA 検出系に IV の NP を検出する AB 型用のキットを組み合わせて一つのセットにし、ベトナムの感染者検体における感度を評価した。その結果、ベトナムで最初に流行した Clade 1 のウイルスは、その後 Clade 2.3.4 に変化しているが、我々のキットは両ウイルスとも検知することが可能であった。しかしながら検出感度においては、AB 型の診断は既存のキットよりも 5~25 倍すぐれていたものの、H5HA 抗原の検出は臨床検体ではウイルス濃度が更に高いものに限られ、NIHE に送られてきた時点ですでに 30 倍に希釈されていることが大きく影響していると考えられた。

様々な H5HA と GFP を同時に発現させた細胞に対する各 H5HA 抗体の反応性はそれぞれ特徴があり、各抗体の認識部位の違いは明確であった。今後様々な株由来 HA を立体的に発現させてエピトープを解析するための系が確立できた。

D. 考察

H5N1-HPAI の遺伝的な多様性は広がっている。その

診断にはこうした遺伝的な違いに関係なく全ての H5N1-HPAI 流行株を高感度かつ特異的に検出できる検査系が望ましい。この手法でウイルス粒子に反応性を持つ抗体を得るためには、ペプチドに反応する抗体を選択するのではなく、界面活性剤や pH の違いによる様々な条件下で変性させたウイルス粒子に対して行う必要がある。

HA2 上の型共通エピトープを認識するモノクローナル抗体を捕捉抗体とすれば、HA1 領域への検出抗体 (HA1 を認識する型特異的抗体) のアクセシビリティが飛躍的に上昇し、これにより検出システムの汎用性 (全 HA 型指向性) と型特異性検出感度が両立することが期待される。

ベトナム感染者の発生現場で検体を直接キットで測定できれば、検出感度は高まると予想されるが、現実的には我々の共同開発した簡易キットの感度を更に改良する工夫が必要である。

E. 結論

抗 H5HA 抗体を用いて東洋紡績と共同開発して条件を最適化した H5/AB キットの性能について、ベトナム H5N1 感染者の凍結臨床検体を用いた外部評価を実施した。感度においてはまだ改良の余地があるものの、感染者発生現場での利用価値はあると考えられた。本研究でキット作製に用いた抗体の性状に関する論文発表、特許申請を完了した。一方、ゲノム配列情報から独自のデータベースを構築し、候補エピトープを絞り込んで、単クローン抗体作製の準備を開始した。また、H5HA の立体的エピトープを解析する系を確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) [Ohnishi K.](#), Takahashi Y., Kono N., Noriko Nakajima N., Mizukoshi F., [Misawa S.](#), Yamamoto T., Mitsuki Y., Fu S., Hirayama N., Ohshima M., Ato M., [Kageyama T.](#), Odagiri T., Tashiro M., Kobayashi K., Itamura S. and [Tsunetsugu-Yokota Y.](#): Immunological detection of H5N1 influenza viruses by newly established monoclonal antibodies. *Jpn.J.Infect.Dis.* 65:13-18, 2012
- 2) Terahara, K., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Ishige, M., Mizukoshi, F., Kobayashi, K. and [Tsunetsugu-Yokota, Y.](#): Fluorescent reporter signals, EGFP and DsRed, encoded in HIV-1 facilitate the detection of

- productively infected cells and cell-associated viral replication levels. *Front. Microbiol.* 2: 1-11, 2012
- 3) Takeuchi, K., Nagata, N., Kato, S., Ami, Y., Suzaki, Y., Suzuki, T., Sato, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mori, K., Nguyen, V. N., Kimura, H. and Nagata, K.: Wild-type measles virus with the hemagglutinin protein of the Edmonston vaccine strain retains wild-type tropism in macaques. *J. Virol* 1: JVI Accepts, published online ahead of print on 11 January 2012 *J. Virol.* doi:10.1128/JVI.06517-11, 2012
 - 4) Salaun, B., Yamamoto, T., Bardran, B., Tsunetsugu-Yokota, Y., Roux, A., Baitsch, L., Rouas, R., Fayyad-Kazan, H., Baumgaertner, P., Devevre, E., Ramesh, A., Braun, M., Speiser, D., Autran, B., Martiat, P., Appay, V., and Romero, P.: Differentiation associated regulation of microRNA expression in vivo in human CD8+ T cell subsets. *J. Transl. Med.* 9:44-52, 2011
 - 5) Fujii, H., Ato, M., Takahashi, Y., Otake, K., Hashimoto, S-I., Kaji, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Fujita, M., Adachi, A., Nakayama, T., Taniguchi, M., Koyasu, S., and Takemori, T.: HIV-Nef impairs multiple T cell functions in antigen-specific immune response in mice. *Int. Immunol.* 23:433-441, 2011
 - 6) Harada, Y., Ninomiya-Mori, A., Takahashi, Y., Shirakura, M., Kishida, N., Kageyama, T., Tada, Y., Tashiro, M., Odagiri, T.: Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice. *Vaccine* 29:8330-7, 2011
 - 7) Nakauchi, M., Yasui, Y., Miyoshi, T., Minagawa, H., Tanaka, T., Tashiro, M. and Kageyama, T.: One-step real-time reverse transcription-PCR assays for detecting and subtyping pandemic influenza A/H1N1 2009, seasonal influenza A/H1N1, and seasonal influenza A/H3N2 viruses. *J Virol Methods.* 171:156-62. 2011
 - 8) Nakauchi, M., Yoshikawa, T., Nakai, H., Sugata, K., Yoshikawa, A., Asano, Y., Ihira, M., Tashiro, M. and Kageyama, T.: Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. *Journal of Medical Virology* 83:10-15, 2011
 - 9) Nakauchi, M., Ujike, M., Obuchi, M., Takashita, E., Takayama, I., Ejima, M., Oba, K., Konomi, K., Odagiri, T., Tashiro, M., Kageyama, T.: The influenza virus surveillance group of Japan. Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. *J Med Virol.* 83:1121-7.2011
 - 10) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Yamamoto, T.: Mammalian microRNAs.: post-transcriptional gene regulation in RNA virus infection and therapeutic applications. *Frontiers in Microbiology* 1:1-9, 2010
 - 11) Hagiwara, K., Murakami, T., Xue, G. Shimizu, Y., Takeda, E., Hashimoto, Y., Honda, K., Kondoh, Y., Osada, H., Tsunetsugu-Yokota, Y. and Aida, Y.: Identification of a novel Vpr-binding compound that inhibits HIV-1 multiplication in macrophages by chemical array. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 401:40-45, 2010
- (総説) 横田 (恒次) 恭子、影山努 : ブタ由来インフルエンザウイルス(A/H1N1pdm)、広範囲血液・尿化学検査免疫学的検査—その数値をどう読むか—(第7版)、(日本臨床社)、日本臨床 68(6): 385-388, 2010
2. 学会発表
 - 1) Mitsuki, Y-y., Shibusawa, K., Terahara, K., Kobayashi, K., Moriakwa, Y., Takeda, M., Yanagi, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress XV International Congress of Virology. Sapporo. September, 2011
 - 2) Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 transmission through immunological synapse and T-cell activation: How can we control virus replication? US-Japan AIDS Panel Meeting, Atlanta, USA, September 21-23, 2011
 - 3) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ishige, M., Mitsuki, Y-y., Shibusawa, K., Okada, S., and Terahara, K.: Impact of selective infection and expansion of

- CCR5-utilizing HIV-1 in CD4+CXCR4high CCR5+ memory T cells in humanized mouse model. 8th German-Japanese HIV-Symposium, Bochum, Germany, November 21-22, 2011.
- 4) 渋沢謙太郎、寺原和孝、石毛真行、光木裕也、横田(恒次)恭子. 麻疹ウイルス偽型化 HIV-1 抑制性 shRNA 発現レンチウイルスベクターのヒト化マウスにおける in vivo 評価. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、12 月、東京、2011
- 5) 石毛真行、寺原和孝、渋沢謙太郎、光木裕也、池野翔太、小林和夫、岡田誠治、横田(恒次)恭子. R5 および X4 HIV-1 同時感染ヒト化マウスモデルによる感染早期のウイルス優位性の解析. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、12 月、東京、2011
- 6) Takayama, I., Shimada, S., Nakauchi, M., Minegishi, T., Tashiro, M., Kageyama, T.: A quantitative definition of the 275H and 275Y proportion in neuraminidase of the pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by real-time duplex RT-PCR assay. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011
- 7) Takayama, I., Takashita, E., Ejima, M., Nakauchi, M., Fujisaki, S., Kim, N., Kishida, N., Hong Xu, Sugawara, H., Itoh, R., Doi, T., Kageyama, T., Odagiri, T. and Tashiro M.: Improved surveillance system to detect antiviral-resistant influenza A/H1N1pdm09 viruses in Japan. Influenza Antivirals: Efficacy and Resistance, Rio de Janeiro, November, 2011
- 8) Takashita, E., Ejima, M., Takayama, I., Nakauchi, M., Fujisaki, S., Kim, N., Kishida, N., Hong Xu, Sugawara, H., Reiko Itoh, Doi, T., Kageyama, T., Masato Tashiro, Takato Odagiri: Detection of antiviral-resistant pandemic influenza A(H1N1)2009 (A/H1N1pdm09) Viruses by a combination of chemiluminescent and fluorescent neuraminidase inhibitor susceptibility assays in JAPAN. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011
- 9) Tsunetsugu-Yokota, Y.: The impact of chemokine receptor usage of HIV-1 in the pathogenesis of HIV infection. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, September, 2010
- 10) Terahara, K., Ishige, M., Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Watanabe, S., Okada, S., Kobayashi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Characteristic activation/differentiation phenotype of CD4+ T cells and their distinct susceptibility to X4-type and/or R5-type HIV-1 infection in humanized NOD/SCID/Jak3-null mice. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August, 2010
- 11) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Terahara, K.: Factors crucial for the preferential propagation of R5-tropic HIV-1 in the early phase of HIV-1 infection. The 5th Japanese-German HIV- Symposium, Tokyo, Japan, May, 2010.
- 12) 石毛真行、寺原和孝、光木裕也、渋沢謙太郎、小林和夫、岡田誠治、横田(恒次)恭子: HIV-1 感染モデルとしてのヒト化マウスの妥当性と X4 および R5 HIV-1 感染, 第 58 回ウイルス学会、徳島、2010
- 13) 渋沢謙太郎、光木裕也、寺原和孝、石毛真之、柳雄介、小林和夫、横田(恒次)恭子: 麻疹ウイルスエンベロープを用いた HIV-1 増殖抑制性レンチウイルスベクターの開発とその有効性、第 58 回ウイルス学会、徳島、2010
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
H5 亜型インフルエンザウイルスを特異的に認識するモノクローナル抗体、出願番号：特願 2011-22774
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特記なし

インフルエンザウイルス型特異的および共通抗原に対する抗体の作成と迅速診断法の確立

所 属 国立感染症研究所 免疫部
研究代表者 横田 恭子

研究要旨

抗 H5HA 抗体を用いて東洋紡績と共同開発した H5/AB キットを最適化してベトナム H5N1 感染者の臨床検体を用いた外部評価を実施した。感度においてはまだ改良の余地があるものの、感染者発生現場での利用できることが期待された。キット作製に用いた抗体の性状に関する論文発表、特許申請を完了した。一方、更なる高感度検出系確立のため、ゲノム配列情報から独自のデータベースを構築して候補エピトープを予測し、抗体作製の準備を開始した。また、立体的エピトープ解析系を確立した。

研究分担者

- (1) 国立感染症研究所
インフルエンザウイルス研究センター
影山 努
- (2) 国立感染症研究所 免疫部 大西和夫
- (3) 東洋紡績(株) 敦賀バイオ研究所
三澤 修平

(委託研究)

国立感染症研究所 免疫部 横田恭子

A. 研究目的

東洋紡績(株) が抗体多孔性フィルター固相化と化学発光免疫測定を組み合わせで開発した、抗原を簡便かつ安全に検出するキットとその自動分析装置に、国立感染症研究所が保有あるいは新たにバイオインフォーマティクス的手法を用いて作製する抗体を利用し、インフルエンザウイルス(IV)の型共通あるいは型特異的抗原エピトープを認識判別する、感度と特異性に優れた IV 検出キットの開発を行う。

B. 研究方法

インフルエンザウイルス・ゲノム配列データベースとこれまで報告されたインフルエンザエピトープの情報を文献および各種データベースより収集し、型共通、型あるいは亜型特異的エピトープの候補領域をバイオインフォーマティクス的手法で解析した。

その予測された候補エピトープ領域について、立体構造解析・分子動力学解析並びに B 細胞エピトープ予測等のアルゴリズムを用いたモノクローナル抗体標的エピトープをデザインし、その特異性・感度を *in silico* で評価した。更に、得られた予測エピトープを標的とするモノクローナル抗体を作成してその実用性を検証した(大西)。

これまでに世界中で流行した様々な H5N1 HPAI 株の赤血球凝集素 (hemagglutinin : HA) のアミノ酸配列を詳細に解析し、H5 亜型に特異的な HA のアミノ酸配列およびエピトープの候補領域を網羅的にリストアップし、その中から立体構造を予測して 3 量体を形成した際に HA の表面に出ている事が予測されるいくつかの領域を選択して、ペプチドを抗原とするマウスモノクローナル抗体の作成を行った。現在、家禽および野鳥で流行している H5N1-HPAI ウイルス粒子に対するモノクローナル抗体の反応性を ELISA 法により確認した(影山)。

検出装置は東洋紡製小型発光免疫自動分析装置 POCube と専用の消耗品類を用い、測定および検出のため、前処理液の検討、検出感度や組換え HA 抗原とウイルス量の相関性、およびインフルエンザ迅速キットとの感度比較や標準抗原安定性試験を実施した (三澤)。

(官民共同研究)

H5HA 高感度検出キットを共同開発し、このキット

とインフルエンザ AB 型検出系をセットとして、ベトナム国立衛生試験所(NIHE)の Dr. Mai らと共同研究により、NIHE が保管する H5N1-HPAI 感染者の凍結臨床検体およびそれからのウイルス分離培養液を用いて検出感度を評価した。また、感染研で分離されているインフルエンザウイルスの HA 部分を PCR で増幅して pIRES-rhGFP (Stratagene 社)に組み込み、それぞれの発現ベクターを作製した。この DNA を 293T 細胞にトランスフェクトして H5HA を立体的に発現させた(横田)。

(倫理面への配慮)

当該施設における倫理委員会や実験動物委員会の承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

H5 亜型で共通のアミノ酸がなるべく多く含まれている部位を選択し、その部位を含むプチドを合成して、マウスモノクローナル抗体を作製した。様々なペプチドに対してそれぞれ反応する抗体を多数得る事ができたが、ウイルス粒子に対する反応性を持つ抗体は得られなかった(影山)。

また、各種ウイルス株由来全長 HA 核酸配列の独自のデータベースを構築し、これをもとにウイルス株間で保存された型共通エピトープと型特異的エピトープの候補配列を網羅的に列挙した。これら予測領域の抗体のエピトープとしての有用性について、型共通性および型特異性、HA2 分子表面への露出度、エピトープ立体構造の性質などを解析して候補配列を絞り込み、抗体作製を開始した(大西)。

これまでに作製した H5N1 特異的モノクローナル抗体のエピトープ反応性や特異性などの抗体の特徴を明らかにして論文に発表した(全員)。

更に、これらの抗体を東洋紡績の抗体多孔性フィルター固相化と化学発光免疫測定を組み合わせで開発した、抗原を簡便かつ安全に検出する自動分析装置(POCube)専用のキットを構築し、その特異性や感度を組換え HA 蛋白や不活化ウイルス溶液で評価し、最適化した(東洋紡績)。

この H5HA 検出系に IV の NP を検出する AB 型用のキットを組み合わせ一つのセットにし、ベトナムの感染者検体における感度を評価した。その結果、ベトナムで最初に流行した Clade 1 のウイルスは、その後 Clade 2.3.4 に変化しているが、我々のキットは両ウイルスとも検知することが可能であった。しかしながら検出感度においては、AB 型の診断は既

存のキットよりも 5~25 倍すぐれていたものの、H5HA 抗原の検出は臨床検体ではウイルス濃度が更に高いものに限られ、NIHE に送られてきた時点ですでに 30 倍に希釈されていることが大きく影響していると考えられた。また、H5HA と GFP を同時に発現するベクターを作製し、モノクローナル抗体の立体的エピロープの解析が容易となった。

D. 考察

H5N1-HPAI の遺伝的な多様性は広がっている。その診断にはこうした遺伝的な違いに関係なく全ての H5N1-HPAI 流行株を高感度かつ特異的に検出できる検査系が望ましい。この手法でウイルス粒子に反応性を持つ抗体を得るためには、ペプチドに反応する抗体を選択するのではなく、界面活性剤や pH の違いによる様々な条件下で変性させたウイルス粒子に対して行う必要がある。

HA2 上の型共通エピトープを認識するモノクローナル抗体を捕捉抗体とすれば、HA1 領域への検出抗体 (HA1 を認識する型特異的抗体) のアクセシビリティが飛躍的に上昇し、これにより検出システムの汎用性 (全 HA 型指向性) と型特異性検出感度が両立することが期待される。

ベトナム感染者の発生現場で検体を直接キットで測定できれば、検出感度は高まると予想されるが、現実的には我々の共同開発した簡易キットの感度を更に改良する工夫が必要である。

E. 結論

抗 H5HA 抗体を用いて東洋紡績と共同開発して条件を最適化した H5/AB キットの性能について、ベトナム H5N1 感染者の凍結臨床検体を用いた外部評価を実施した。感度においてはまだ改良の余地があるものの、感染者発生現場での利用価値はあると考えられた。本研究でキット作製に用いた抗体の性状に関する論文発表、特許申請を完了した。一方、ゲノム配列情報から独自のデータベースを構築し、候補エピトープを絞り込んで、モノクローナル抗体作製の準備を開始した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ohnishi K., Takahashi Y., Kono N., Noriko

- Nakajima N., Mizukoshi F., Misawa S., Yamamoto T., Mitsuki Y., Fu S., Hirayama N., Ohshima M., Ato M., Kageyama T., Odagiri T., Tashiro M., Kobayashi K., Itamura S. and Tsunetsugu-Yokota Y. : Immunological detection of H5N1 influenza viruses by newly established monoclonal antibodies. *Jpn.J.Infect.Dis.* 65:13-18, 2012
- 2) Terahara, K., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Ishige, M., Mizukoshi, F., Kobayashi, K. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Fluorescent reporter signals, EGFP and DsRed, encoded in HIV-1 facilitate the detection of productively infected cells and cell- associated viral replication levels. *Front. Microbiol.* 2: 1-11, 2012
 - 3) Takeuchi, K., Nagata, N., Kato, S., Ami, Y., Suzaki, Y., Suzuki, T., Sato, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mori, K., Nguyen, V. N., Kimura, H. and Nagata, K. : Wild-type measles virus with the hemagglutinin protein of the Edmonston vaccine strain retains wild-type tropism in macaques. *J. Virol* 1: JVI Accepts, published online ahead of print on 11 January 2012 *J. Virol.* doi:10.1128/JVI.06517-11, 2012
 - 4) Salaun, B., Yamamoto, T., Bardran, B., Tsunetsugu-Yokota, Y., Roux, A., Baitsch, L., Rouas, R., Fayyad-Kazan, H., Baumgaertner, P., Devevre, E., Ramesh, A., Braun, M., Speiser, D., Autran, B., Martiat, P., Appay, V. and Romero, P.: Differentiation associated regulation of microRNA expression in vivo in human CD8+ T cell subsets. *J. Transl. Med.* 9:44-52, 2011
 - 5) Fujii1, H, Ato, M., Takahashi, Y., Otake, K., Hashimoto, S-I., Kaji, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Fujita, M., Adachi, A., Nakayama, T., Taniguchi, M., Koyasu, S. and Takemori, T.: HIV-Nef impairs multiple T cell functions in antigen-specific immune response in mice. *Int. Immunol.* 23:433-441, 2011
 - 6) Harada, Y., Ninomiya-Mori, A., Takahashi, Y., Shirakura, M., Kishida, N., Kageyama, T., Tada, Y., Tashiro, M. and Odagiri, T.: Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice. *Vaccine* 29(46):8330-7, 2011
 - 7) Nakauchi, M., Yasui, Y., Miyoshi, T., Minagawa, H., Tanaka, T., Tashiro, M. and Kageyama, T.: One-step real-time reverse transcription-PCR assays for detecting and subtyping pandemic influenza A/H1N1 2009, seasonal influenza A/H1N1, and seasonal influenza A/H3N2 viruses. *J Virol Methods.* 171(1):156-62. 2011
 - 8) Nakauchi, M., Yoshikawa, T., Nakai, H., Sugata, K., Yoshikawa, A., Asano, Y., Ihira, M., Tashiro, M. and Kageyama, T.: Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. *Journal of Medical Virology* 83(1):10-15, 2011
 - 9) Nakauchi, M., Ujike, M., Obuchi, M., Takashita, E., Takayama, I., Ejima, M., Oba, K., Konomi, K., Odagiri, T., Tashiro, M. and Kageyama, T.: The influenza virus surveillance group of Japan. Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. *J Med Virol.* 83(7):1121-7.2011
2. 学会発表
- 1) Mitsuki, Y-y., Shibusawa, K., Terahara, K., Kobayashi, K., Moriakwa, Y., Takeda, M., Yanagi, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. International Union of Micro- biological Societies 2011 Congress XV International Congress of Virology. Sapporo. September, 2011
 - 2) Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 transmission through immunological synapse and T-cell activation: How can we control virus replication? US-Japan AIDS Panel Meeting, Atlanta, USA, September 21-23, 2011
 - 3) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ishige, M., Mitsuki, Y-y., Shibusawa, K., Okada, S., and Terahara, K.: Impact of selective infection and expansion of CCR5-utilizing HIV-1 in CD4+CXCR4high CCR5+ memory T cells in humanized mouse model. 8th German-Japanese HIV- Symposium, Bochum, Germany, November 21-22, 2011.
 - 4) 渋谷謙太郎、寺原和孝、石毛真行、光木裕也、