

## D. 考察

本研究の結果、あらかじめ特定の生理活性物質で薬理的刺激を受けた MSC は、造血幹細胞の増殖を促進する可能性が示唆された。実際の臨床試験においても、培養増幅した自家 MSC を経静脈的に投与することにより大量化学療法後の造血回復が促進されることや、同種造血幹細胞の移植時に同一ドナーに由来する MSC をあわせて移植すると、造血幹細胞の生着が促進する事が報告されている。本研究はこのような MSC の有する造血支持能を、*in vitro* の培養系で増強することが可能であることを示しており、今後、薬理的な MSC の機能腑活化が、骨髄内骨髄移植後の生着促進にも有用である可能性が示唆された。

## E. 結論

*In vitro* で培養腑活化された MSC は、CD34 陽性細胞の増幅を増強し得ることが明らかとなった。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kanda J, Hishizawa M, 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. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. *Blood* 2012;119:2141-2148.
- 2) Sato T, Ichinohe T, Kanda J, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T, Takaori-Kondo A. Clinical significance of subcategory and severity of chronic

graft-versus-host disease evaluated by National Institutes of Health consensus criteria. *Int J Hematol.* 2011;93:532-541.

- 3) Itamura H, Fukushima N, Kondo S, Urata C, Tanaka-Yoshimura M, Yokoo M, Ide M, Hisatomi T, Kubota Y, Sueoka E, Ichinohe T, Kimura S. Successful reduced-intensity umbilical cord blood transplant for fulminant hemophagocytic syndrome in an adult with preexisting rheumatoid arthritis and autoimmune hemolytic anemia. *Leuk Lymphoma.* (in press)

### 2. 学会発表

- 1) Ichinohe T. Microchimerism-associated tolerance to noninherited maternal antigens (NIMAs) reduces severity of GVHD after MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation by a CD4+CD25+ T-cell-dependent mechanism. The 16th Annual Summer Meeting of the Korean Society of Blood and Marrow Transplantation. Busan, Korea, August 19, 2011.
- 2) Iida M, Kanda Y, Toubai T, Nakase K, Mitamura M, Kanda J, Fukuda T, Miyamura K, Kanamori H, Mori T, Iida H, Atsuta Y, Morishima Y, Sakamaki H, Ichinohe T. On behalf of the Hematopoietic Stem Cell Transplantation from Foreign Donors Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT). Unrelated hematopoietic stem cell transplantation from foreign donors: current status in Japan. 16th Congress of Asia Pacific Blood and Marrow Transplantation, Sydney, Australia, October 30-31, 2011.
- 3) Ichinohe T. Emerging roles of non-inherited maternal alloantigens (NIMAs) and inherited paternal alloantigens (IPAs) in HLA-mismatched hematopoietic cell transplantation. The Joint Meeting of the 17th International Symposium on

Gnotobiology and the 34th Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease. Yokohama, Japan, November 21, 2011.

(研究協力者発表分)

- 4) Yao H, Miura Y, Yoshioka S, Hayashi Y, Hirai H and Maekawa T. Parathyroid hormone stimulates human mesenchymal stem cells to enhance the expansion of hematopoietic stem cells. The 53rd Annual Meeting of American Society of Hematology, San Diego, California, U.S.A., December 10-13, 2011.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

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の安全性、  
有用性を目指した研究

分担研究者 小川 啓恭（兵庫医科大学 内科学講座血液内科教授）

研究要旨

灌流法による骨髄細胞の採取とそれを用いた骨髄内骨髄移植は、サルなどの動物実験のデータから、通常の骨髄移植と比べて、移植片の骨髄への生着率の飛躍的な向上、移植片対宿主病発症率の低下など、様々な利点が考えられた。本研究では、この治療法のヒトへの応用に際して、その安全性、有用性の検討を行った。灌流法による骨髄細胞の採取を、2例で実施したが、通常の吸引法による骨髄採取と比べて、赤血球の混入が多い、採取した細胞成分に差がないという結果であった。したがって、灌流法による骨髄細胞の採取法の技術面の改善が必要という結論である。一方、採取した骨髄細胞を骨髄内移植するためには、赤血球を除去し、20-24mlに濃縮して移植を行う必要があり、この骨髄内移植の後半部分の研究を同時に進める必要がある。

A. 研究目的

関西医科大学、池原らによって考案された「灌流法による骨髄細胞の採取とそれを骨髄内に移植するという新しい骨髄移植法」は、膨大な量の動物実験データより、その有効性が示唆されている。たとえば、灌流法による骨髄細胞の採取は、1)末梢血の混入が少なく、その結果、移植片対宿主病(graft-versus-host disease=GVHD)を惹起するT細胞の混入が少ない、2)通常の吸引法に比べて、赤血球の混入が少なく、遠心法のみで骨髄細胞浮遊液の容積を大幅に減らすことができること、また、骨髄内への移植は、静脈内への移植に比べて、3)造血幹細胞が高率に骨髄へ生着することが期待されること、4)骨髄は、免疫が抑制された環境にあるため、GVHDが少なく、MHC不適合移植片でも許容される可能性があることなどの有用性が示されている。しかし、ヒトでの安全性および有用性は不明である。したがって、本研究は、この新規移植法のヒトにおける安全性と有効性を検討することを目的にしている。静脈内への移植に比べて、3)造血幹細胞が高率に

骨髄へ生着することが期待されること、4)骨髄は、免疫が抑制された環境にあるため、GVHDが少なく、MHC不適合移植片でも許容される可能性があることなどの有用性が示されている。しかし、ヒトでの安全性および有用性は不明である。したがって、本研究は、この新規移植法のヒトにおける安全性と有効性を検討することを目的にしている。

B. 研究方法

対象患者は、慢性骨髄性白血病（第2慢性期以降）、急性骨髄性白血病（初回寛解期を除く）、急性リンパ性白血病（初回寛解期を除く）、骨髄異形成症候群（IPSSでintermediate-IIまたはhigh）、悪性リンパ腫（治療抵抗性も低悪性度リンパ腫、化学療法抵抗性の中等度リンパ腫、初回寛解期を除いた高悪性度リンパ腫）とした。ただし、白血病においては、芽球30%以下の症例を対象とした。患者年齢は、12歳以上65歳以下とした。患者のperformance statusは、ECOGの基準で0-1とした。ドナーは、血縁ドナーとし、HLA適合または、

GVH 方向 3 抗原不適合までのドナーとした。関西医科大学で、灌流法による骨髄採取を行い、それを兵庫医科大学に運び、患者に移植を行うこととした。試験の主要評価項目は、「灌流法による骨髄採取に伴う安全性」とした。

#### (倫理面への配慮)

「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」のプロトコールは、関西医科大学と兵庫医科大学の倫理委員会で承認された。患者とドナーから、書面による informed consent を得た後、試験は実施された。移植の前処置が開始されるまでであれば、いつでも患者の自由意思で撤回することが可能であった。また、試験結果が公表される際は、患者個人が特定できないように、匿名化がなされるなど、ヘルシンキ宣言に基づいて、試験は実施された。

#### C. 研究結果

灌流法による骨髄採取を 2 例施行した。骨髄細胞の採取に際しては、左右の腸骨で、採取される細胞成分に関して、灌流法による骨髄採取と通常吸引法による骨髄採取を比較検討した。その結果、CD34 陽性細胞率、T 細胞の混入率において、両者の間で差を認めなかった。さらに、灌流法による骨髄採取においては、赤血球の混入率が高く、プロトコールに記載されているような、遠心分離法による血球成分の濃縮だけでは、骨髄内移植に用いることができなかった。このため、同時並行で、前処置を行っていた患者に対しては、吸引法で採取した骨髄を、通常の方法に準じて、静脈内へ輸注することにより、移植を行った。

#### D. 考察

2 例の灌流法による骨髄採取の経験から、採取される細胞成分において、灌流法と吸引法とで、差を認めなかったことから、灌流法による骨髄採取の手法において、改良を加える必要があることが判明し

た。また、赤血球の混入が多いことから、灌流法で採取した後、赤血球を除去する行程が必要なことが判明した。骨髄内に移植した骨髄移植を、骨髄腔内に留め置くためには、骨髄内臍帯血移植の経験から、両側腸骨の 4 か所に、注入するとして、1 か所当たり、5-6 ml の volume に抑える必要がある。したがって、容量として、20-24 ml 以内に採取した骨髄細胞を濃縮

#### D. 結論

上記の問題点を解決するため、1) 灌流法による骨髄採取の手技を改善すること、2) 幹細胞を失うことなく、赤血球を除去する方法の開発を合わせて進める必要がある。灌流法による骨髄採取法が完成した後に、スムーズに骨髄内骨髄移植ができるように、通常吸引法で採取した骨髄細胞を濃縮し、それを骨髄内へ移植する部分の開発を同時に行う必要がある。さらに、灌流法で採取した骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植法の有用性を証明するためには、吸引法で採取した骨髄細胞と比較する必要があり、そのためにも、この研究は重要と考える。

#### F. 健康危険情報

灌流法による骨髄採取において、合併症は認められなかった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kazuhiro Ikegame, Satoshi Yoshihara, Yuki Taniguchi, Katsuji Kaida, Takayuki Inoue, Masaya Okada, Kyoko Taniguchi, Hitomi Hasei, Hiroya Tamaki, Tatsuya Fujioka, Ruri Kato, Toshihiro Soma, Hiroyasu Ogawa. Allogeneic stem cell transplantation as treatment for heavily treated, refractory acute graft-versus-host disease after HLA-mismatched stem cell transplantation. *Exp. Hematol.* 39: 880-890, 2011.
- 2) Masaya Okada, Satoshi Yoshihara, Kyoko Taniguchi, Katsuji Kaida, Kazuhiro Ikegame, Ruri Kato, Hiroya Tamaki, Takayuki Inoue, Toshihiro Soma, Shunro Kai, Shunichi Kato, Hiroyasu Ogawa. Intrabone marrow transplantation of unwashed cord blood using reduced-intensity conditioning treatment: A Phase I Study. *Biol Blood Marrow Transplant* 18: 633-639, 2012.

### 2. 学会発表

- 1) Ogawa H. Haplo-identical HCT from family members. The 1st international scientific symposium on hematopoietic stem cell transplantation in emerging countries. November 10-12, 2011. (Hanoi, Bietnam)
- 2) Ogawa H. (JSA-EHA Joint Symposium – Stem Cell Source). Unmanipulated HLA-haploidentical stem cell transplantation.  
第73回日本血液学会学術集会.  
2011.10.15. (名古屋)
- 3) 井上貴之、池亀和博、吉原 哲、海田勝仁、谷口享子、玉置広哉、藤岡龍哉、岡田昌也、加藤るり、山本庸子、相馬俊裕、小川啓恭.  
Host regulatory T cells contribute to the regulation of GVHD in murine MHC haploidentical BMT models.  
第73回日本血液学会学術集会.  
2011.10.14. (名古屋)
- 4) Kaida K, Ikegame K, Yoshihara S, Taniguchi K, Ishii S, Kato R, Inoue T, Okada M, Tamaki H, Fujioka T, Soma T, Ogawa H. Unmanipulated HLA-haploidentical (2-3 antigen-mismatched) stem cell transplantation using myeliablative or reduced-intensity preconditioning regimen. The 53th annual meeting of the American Society of Hematology. December 10-13. (San Diego, USA).
- 5) Ogawa H. Presidential Symposium, Cord blood stem cell transplantation: from the bench to the bed, Intra-bone marrow transplantation of unwashed cord blood using reduced-intensity conditioning treatment.  
第34回日本造血細胞移植学会.  
2012.2.2 (大阪)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療 研究事業）  
分担研究報告書

ウイルス抗原特異的細胞傷害性 T 細胞による造血幹細胞移植後の難治性感染症の治療  
分担研究者 小島 勢二（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授）

**研究要旨**

ウイルス抗原特異的細胞傷害性 T 細胞による臨床第 1,2 相試験を行った。造血細胞移植の HLA-A2 または A24 陽性ドナー末梢血よりサイトメガロウイルス（CMV）、EB ウイルス（EBV）に対する CTL を誘導した。培養は CMV が 8 名、EBV が 17 名で行い、うち CMV-CTL の投与を 4 名で行った。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なかった。3 名の患者で投与後 CMV-DNA の低下、消失を認めた。

**A. 研究目的**

造血幹細胞移植後の患者における難治性ウイルス感染症に対し、臨床応用可能なウイルス特異的 CTL の体外増幅法を開発し、移植後の難治性ウイルス感染症に対して臨床第 1、2 相試験を行う。

**B. 研究方法**

造血細胞移植 HLA-A2 または A24 陽性ドナーの末梢血 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基づき 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 細胞に加え閉鎖的培養無菌バッグにより培養した。初回投与細胞数、 $1 \times 10^5/\text{kg}$  より漸増し、計 3 回の投与を行い、投与前後の末梢血ウイルス DNA の評価を行う。

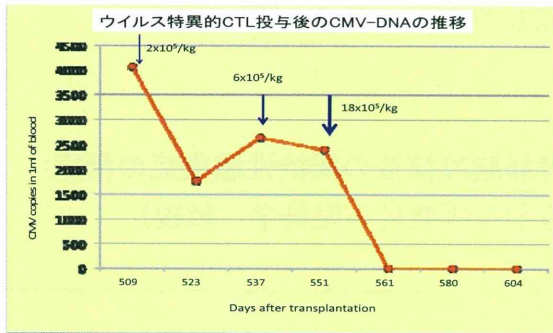
**（倫理面への配慮）**

本研究は名古屋大学医学部バイオ先端臨床研究審査委員会の承認後、ドナーから文書による同意を得ておこなう。

**C. 研究結果**

造血細胞移植の HLA-A2 または A24 陽性ドナー末梢血よりサイトメガロウイルス（CMV）、EB ウイルス（EBV）に対する CTL を誘導した。培養は CMV が 8 名、EBV が 17 名で行い、それぞれ 5 名、7 名で初回投与基準を満たす細胞数の増殖が得られた。うち培養上清中に含まれるウイルス検査の基準も満たしたのは、3 名、3 名であった。細胞培養上清中に EBV ウイルスを認めた 3 例中 3 例で生細胞中の EBNA 陽性細胞は感度以下であったことから、細胞上清中のウイルス定量 PCR 法が既に傷害されたウイルス DNA を同定していると考えられたためウイルス検査基準の見直しを行なった。

GCV 耐性 CMV 感染を起こした患者 4 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なかった。3 名の患者で投与後 CMV-DNA の低下、消失を認めた。CTL 投与後の CMV-DNA の消失および患者体内での CMV-CTL の増加を示す（下図）



別の1名は2回のCTL投与後にウイルスDNAの減少が見られなかったため、ホスカビルの投与を行いCMV-DNAは消失した。

#### D. 考察

骨髄移植ドナーから3-4週間の培養期間でCMVまたはEBV特異的CTLを臨床応用可能なレベルまで培養増幅することができた。

当院倫理委員会での承認後、臨床第1,2相試験が開始された。4名の投与はいずれも安全に投与でき、うち3名で効果が見られた。培養に3-4週間かかること、投与基準をみたらCTLが得られるのはCMV特異的CTLで約50%、EBV特異的CTLでは約30%であることから、EBV特異的CTLの誘導ペプチドの追加など培養法の改善が必要と考えられ、またリスクの高い移植患者ではあらかじめドナーより培養し凍結しておくことが望ましいと考えられた。

#### E. 結論

臨床第1,2相試験が開始された。まだ投与例が少なく、今後さらにCTL培養条件を改善し、症例数を増やす必要があるものの、いずれも安全に投与可能であり、明らかな効果の見られた症例も認められた。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Muramatsu H, Takahashi Y, Shimoyama Y, Doisaki S, Nishio N, Ito Y, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Ito M, Kojima S. CD20-negative Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphoproliferative disease refractory to rituximab in a patient with severe aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2011 Jun;93(6):779-81.
- 2) Nishio N, Takahashi Y, Ohashi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Kojima S. Reduced-intensity conditioning for alternative donor hematopoietic stem cell transplantation in patients with dyskeratosis congenita. *Pediatr Transplant*. 2011 Mar;15(2):161-6.

##### 2. 学会発表

- 1) 高橋義行、造血幹細胞移植後難治性ウイルス感染症に対するウイルス特異的抗原特異的細胞障害性T細胞(CTL)の対外増幅法の開発と臨床第一相試験、日本造血細胞移植学会・日本再生医療学会合同シンポジウム、第34回日本造血細胞移植学会総会(2012年2月24日、大阪国際会議場、大阪)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

骨髄内骨髄移植マウスモデルを用いた移植後肺障害に関する検討  
分担研究者 品川 克至（岡山大学医学部 血液・腫瘍内科 講師）

研究要旨

移植後肺障害 Idiopathic pneumonia syndrome (IPS)は、移植後に肺胞障害により発症する予後不良な肺合併症であり、肺への放射線照射 RT とドナー免疫担当細胞の関与などが想定されている。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-SCT) 後では多くが肺へトラップされるが、骨髄内骨髄移植 (IBM-BMT) では少ないと考えられる。我々は IBM-SCT では IV-SCT よりも IPS の発症が軽減されるとの仮説を IPS のマウスモデルにより比較検討した。移植後 IBM-SCT では GVHD の重症度が低く生存率が優れていた。移植 6 週後の気管支肺胞洗浄では、IBM-SCT において IV-SCT よりも回収液中の総細胞数および T 細胞数が有意に少なく、組織学的にも細胞浸潤、組織障害が軽度であった。また BLI 分析では、移植後 1 時間では IV-SCT でほとんどの細胞が肺に取り込まれたが、IBM-SCT では肺に取り込まれた細胞は有意に少なかった。移植後 2 日目の肺局所組織での各種ケモカイン mRNA 発現は、IV-SCT で高い傾向にあり CCL2 では有意であった。以上より移植早期の輸注細胞の肺へのとりこみは IV と IBM の輸注手技の違いによることが示唆された。移植後 5 日目の BLI 分析では syngeneic の系において肺への取り込みは IV-SCT と IBM-SCT で差はなかったが、allogeneic の系では移植後 2 日目よりさらに有意に IV-SCT で増加した。以上から IPS は IBM-SCT において軽度である可能性が示唆され、移植後早期の輸注細胞の肺での物理的動態およびケモカイン発現の差異がこれらの現象に関与していると考えられた。

A. 研究目的

移植後肺障害 Idiopathic pneumonia syndrome (IPS) は、移植後に広汎な肺胞障害を生じて発症する予後不良な肺合併症の総称であり、肺への放射線照射 RT とドナー免疫担当細胞の関与などが考えられている。診断基準は、a) 広範な肺胞障害の存在、b) 下気道感染症の否定、である。胸部 X-P、CT 上の多発浸潤影の出現、肺炎の臨床症状、肺機能障害（低 O<sub>2</sub> 血症、拘束性肺機能障害）が見られる。また細菌、真菌、ウイルス感染を否定することが必要である。頻度は、同種移植では再生不良性貧血など非腫瘍性疾患では 3~7%、白血病など腫瘍性疾患では 7~10%、自己移植後では 6%といわれており、悪性腫瘍に対する同種移植後に多い。発症時期は移植後、中央値で 21 日といわれているが、2 ヶ月以降

の発症もある。死亡率は 60~82%であり予後はきわめて不良である。発症に関与する危険因子として、前述の悪性腫瘍に対する同種移植の他、高齢、全身放射線照射(TBI)、移植片対宿主病(GVHD)などが推定されている。

病態メカニズムは明らかでないが、TBI による組織障害によりサイトカインの誘導や、肺上皮細胞での MHC、補助シグナル、接着因子の発現上昇などが発生し、肺局所へのドナー細胞の流入と活性化がおこり、肺胞上皮とドナー T 細胞の接触による免疫反応、および RT による肺障害の両者により発症することが推定されている。

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-SCT) 後では多くが肺へトラップされるが、骨髄内骨髄移植 (IBM-SCT) 後では少な



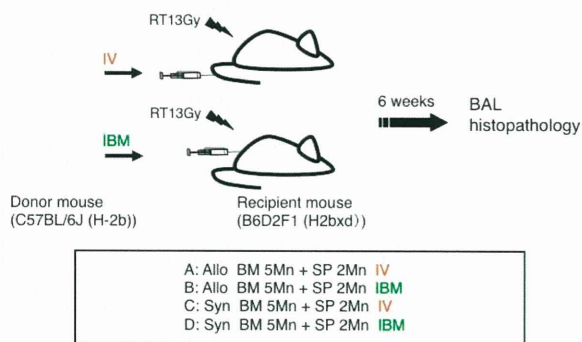
いと考えられる。池原らは、マウスモデルを用いて、IBM-SCT では IV-SCT よりも GVHD が抑制されることを報告している。我々は IBM-SCT では IV-SCT よりも IPS の発症が軽減されるとの仮説を立て、マウスモデルを用いて IPS に関して IBM-SCT と IV-SCT との比較検討を行った。

## B. 研究方法

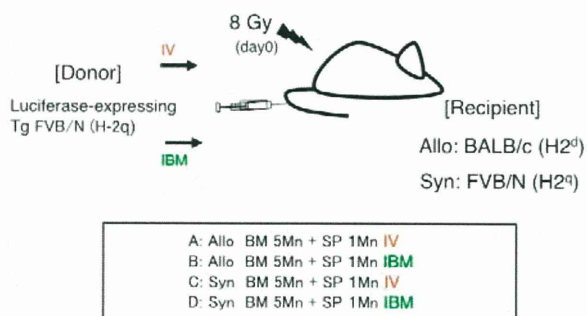
ドナーマウスに C57BL/6J を使い、RT で前処置したレシピエントマウス B6D2F1 に IV-SCT と IBM-SCT を行い比較検討した。

移植後の、体重および GVHD スコア、生存率を評価した。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するとともに、肺組織から抽出した mRNA におけるサイトカイン発現レベルを測定した。(図 1) 次にドナーマウスに FVB/N lac+, レシピエントに BALB/c を用いた系で、in vivo bioluminescence imaging (BLI) 分析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-SCT と IBM-SCT で比較検討した。(図 2)

(図 1)



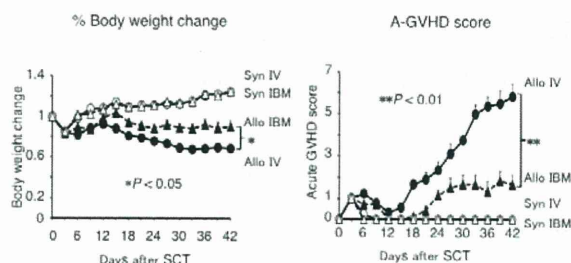
(図 2)



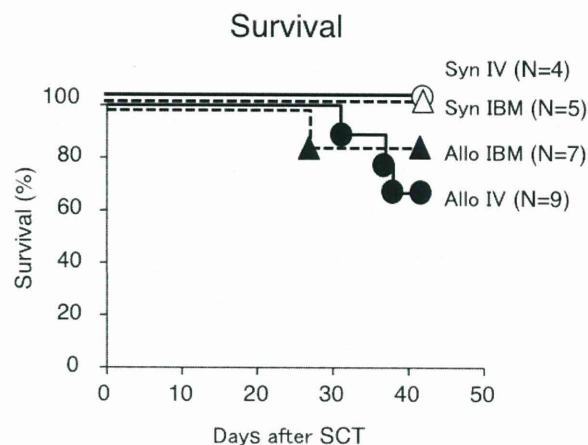
## C. 研究結果

移植 6 週間において、IBM-SCT で体重減少が低く ( $p < 0.05$ )、また GVHD スコアも低く ( $p < 0.01$ )、生存率が高かった。(図 3,4)

(図 3)

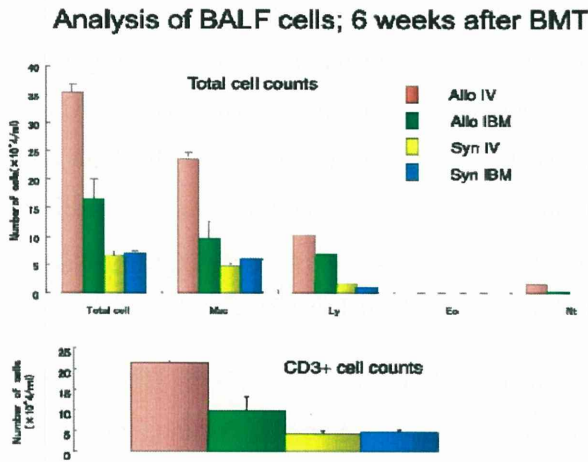


(図 4)

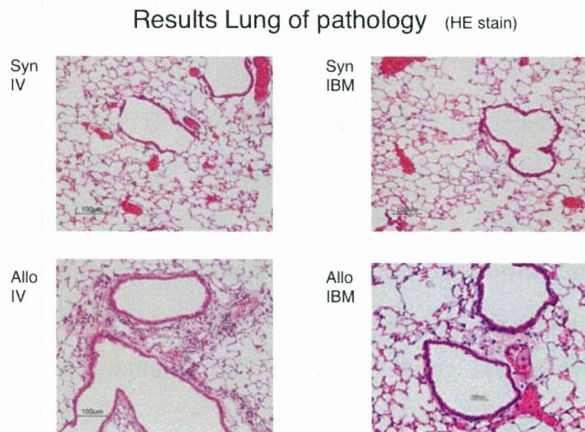


同じく移植 6 週後の BAL の解析では、回収洗浄液中の総細胞数および T 細胞数は、IBM-SCT において IV-SCT よりも少ない傾向にあり、組織学的にも IBM-SCT において細胞浸潤、組織障害が軽度であった。(図 5,6)

(図 5)



(図 6)

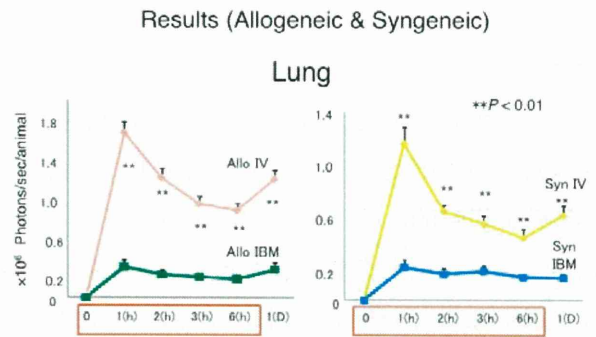


さらにルシフェラーゼによる発光反応を用いた *in vivo* bioluminescence imaging (BLI)分析による解析では、IBM-SCT では IV-SCT に比し移植後早期 (1-6 時間) の肺への移植細胞の集積が少なかった。移植後 1h では IV-SCT 群でほとんどの細胞が肺に取り込まれたが、IBM-SCT 群では輸注下肢にとどまり肺に取り込まれた細胞は有意に少なかった ( $3.1 \pm 0.7$  vs  $16.7 \pm 1.1 \times 10^5$  photons/sec/animal, IBM-SCT vs IV-SCT;  $p < 0.01$ )。 (図 7)

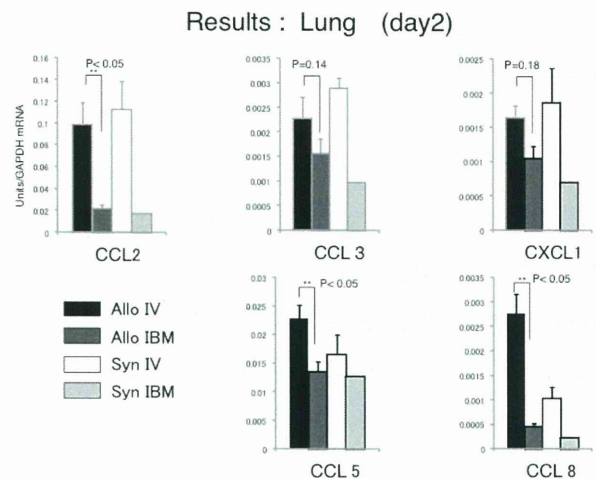
次に移植後 2 日目の肺組織から抽出した mRNA における各種ケモカインの発現レベルは、IV-SCT 群で高い傾向にあり、特に CCL2 では有意であった ( $0.098 \pm 0.020$  vs  $0.020 \pm 0.003$  units/GAPDH mRNA ;  $p < 0.05$ )。 (図 8)

以上の 2 つの結果は syngeneic の系においても同様の結果が得られたため ( $2.4 \pm 0.6$  vs.  $11.6 \pm 1.3 \times 10^5$  photons/sec/animal;  $p < 0.01$ )、移植早期の輸注細胞の肺へのとりこみは IV と IBM の輸注手技の違いによることが示唆された。移植後 2 日目と 5 日目の BLI 分析では、5 日目では syngeneic の系において肺への取り込みは IV-SCT 群と IBM-SCT 群で差はなかったが ( $4.8 \pm 1.1$  vs.  $4.6 \pm 2.5 \times 10^7$  photons/sec/animal;  $p = 0.94$ )、allogeneic の系では移植後 2 日目よりさらに有意に IV-SCT で増加した ( $50.9 \pm 6.6$  vs  $16.0 \pm 6.2 \times 10^7$  photons/sec/animal;  $p < 0.05$ ) (図 9)

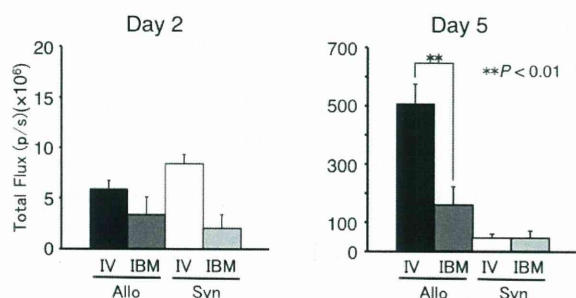
(図 7)



(図 8)



(図 9)



以上から IPS は IBM-SCT において軽度である可能性が示唆された。また肺障害のメカニズムとして移植 2 日までのドナー細胞の肺へのトラップに加え、各種ケモカイン mRNA 発現増加が allo 免疫反応を誘導していると考えられた。

#### D. 考察

IPS マウスモデルによる IV-SCT と IBM-SCT の比較研究は過去に無く、今回肺局所のリンパ球の集積の差異が経時的に *in vivo* 観察され、その機序がケモカインレベルで証明された意義は大きいと思われる。IBM-SCT が移植後肺障害軽減の点からも有効であることが示唆され臨床応用が期待される。今後さらに IPS 発症に関与する T 細胞でのサイトカインや細胞表面マーカーの発現変化を明らかにする事が課題である。

#### E. 結論

今回検討した IPS マウスモデルでは IPS は IV-SCT 群に比し IBM-SCT 群において軽度である可能性が示唆され、移植後早期の輸注細胞の肺での物理的動態およびケモカイン発現の差異がこれらの現象に関与していると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) H Nishimori, Y Maeda, T Teshima, H Sugiyama, K Kobayashi, Y Yamasuji, S Kadohisa, H Uryu, K Takeuchi, T Tanaka, T Yoshino, Y Iwakura and M Tanimoto. Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by down-regulating Th1 and Th17 Blood 119:285-295, 2012.
- 2) Y Yamasuji, H Nishimori, M Fujii, H Sugiyama, K Kobayashi, S Okamoto, E Kondo, N Fujii, K Shinagawa, T Kanekura, M Tanimoto, Y Maeda. Prevention of Idiopathic Pneumonia Syndrome by Intra-bone Marrow Injection of Donor Cells. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 118:1902. 2011.
- 3) Y Yamasuji, H Nishimori, M Fujii, H Sugiyama, K Kobayashi, S Kadohisa, E Kondo, K Shinagawa, K Mominoki, T Kanekura, M Tanimoto, Y Maeda. Prevention of Idiopathic Pneumonia Syndrome by Intra-bone Marrow Injection of Donor Cells. Biology of Blood and Marrow Transplantation 17(2) Supplement, S323, 2011.
- 4) H Sugiyama, Y Maeda, H Nishimori, K Kobayashi, M Nishie-Kataoka, T Teshima, and M Tanimoto. Cyclosporine, but Not mTOR Inhibitors, Hampers the Reconstitution of Bone Marrow-Derived Tregs in Long-Term Complete Donor chimeras. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)112:2331. 2008.

##### 2. 学会発表

- 1) Y Yamasuji, H Nishimori, M Fujii, H Sugiyama, K Kobayashi, S Okamoto, E Kondo, N Fujii, K Shinagawa, T Kanekura, M Tanimoto, Y Maeda. Prevention of Idiopathic Pneumonia Syndrome by Intra-bone Marrow Injection of Donor Cells. December 12, 2011, American Society of Hematology. 53th Annual Meeting and Exposition

- 2) Y Yamasuji, H Nishimori, M Fujii, H Sugiyama, K Kobayashi, S Kadohisa, E Kondo, K Shinagawa, K Mominoki, T Kanekura, M Tanimoto, Y Maeda. Prevention of Idiopathic Pneumonia Syndrome by Intra-bone Marrow Injection of Donor Cells. 2011 BMT tandem meetings, February 17, 2011, Honolulu, Hawaii
- 3) H Sugiyama, Y Maeda, H Nishimori, K Kobayashi, M Nishie-Kataoka, T Teshima, and M Tanimoto, Cyclosporine, but Not mTOR Inhibitors, Hampers the Reconstitution of Bone Marrow-Derived Tregs in Long-Term Complete Donor chimeras. December 6, 2008, American Society of Hematology 50th Annual Meeting and Exposition

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきこと無し

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療 研究事業）  
分担研究報告書

臍帯血を用いた骨髄内移植療法の開発

分担研究者 村田 誠（名古屋大学医学部附属病院 血液内科 講師）

研究要旨

骨髄非破壊的前治療を用いた臍帯血移植の適応となる成人血液悪性疾患患者を対象として、解凍した臍帯血を洗浄・濃縮し、直接骨髄内へ輸注する移植法の臨床試験を行っている。本年度は 3 例に対して試験を実施した。重篤な有害事象は認めず、いずれの症例においても速やかな生着を確認した。

A. 研究目的

本研究では、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の向上を目指し、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を実施し、その安全性と有効性を確認する。

本試験を通じて得られる、例えば臍帯血の洗浄・濃縮技術や骨髄への注入技術などは、将来の「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」の確立に寄与するものと考える。

B. 研究方法

本試験のデザインは臨床第 II 相試験。対象は骨髄非破壊的前治療を用いた非血縁臍帯血移植の適応となる成人血液悪性疾患患者。主として、フルダラビン+シクロフォスファミドによる前治療法と、短期メソトレキセート+タクロリムスによる GVHD 予防法を用いる。解凍した臍帯血を洗浄、濃縮したのち、後腸骨稜から通常の骨髄穿刺針を用いて注入する。主要評価項目は移植後 60 日時点での生着かつ生存。予定登録数は 22 例で、登録期間は 4 年。追跡期間は最終症例の移植後 1 年。

C. 研究結果

本年度は 3 例に対して試験を実施し、総実施数は 10 例となった。重篤な有害事象は認めず、いずれの症例においても速やかな生着を確認した。平成 23 年 3 月末で試験期間終了の予定であったが、予定登録症例数をまだ満たさないこと、しかしながら今後も新規登録症例が見込めることなどから、試験期間の延長手続きを行った。既に名古屋大学の生命倫理審査委員会で承認が得られている（平成 24 年 2 月 20 日承認、承認番号 550-3）。

D. 考察

造血幹細胞を用いた臨床研究を行う際には、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」との関係を確認した上で、実施の判断をする必要がある。

試験期間を 2015 年 3 月まで延長した。また本試験の多施設共同研究への拡大を進めている。登録症例数の増やし完遂を目指す。

E. 結論

引き続き、安全性に配慮しながら本試験を進める。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Waki F, Murata M, et al. Feasibility of reduced-intensity cord blood transplantation as salvage therapy for graft failure: results of a nationwide survey of 80 adult patients. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2011; 17(6): 841-851.
  - 2) Terakura S, Murata M, et al. A prospective dose-finding trial using a modified continual reassessment method for optimization of fludarabine plus melphalan conditioning for marrow transplantation from unrelated donors in patients with hematopoietic malignancies. *Ann Oncol*. 2011; 22(8): 1865-1871.
  - 3) Katsumi A, Murata M, et al. Virus-associated hemophagocytic syndrome caused by pandemic swine-origin influenza A (H1N1) in a patient after unrelated bone marrow transplantation. *J Clin Exp Hematop*. 2011; 51(1): 63-65.
  - 4) Nishiwaki S, Murata M, et al. Dexamethasone palmitate successfully attenuates hemophagocytic syndrome after allogeneic stem cell transplantation: macrophage-targeted steroid therapy. *Int J Hematol*. 2012 Feb 15. [Epub ahead of print]
- 3) Oshima K, Murata M, et al. The effect of sex mismatch on outcome in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 2012 BMT Tandem Meetings, in San Diego, California. February 2012.
  - 4) 村田 誠、他. Grade II 以上の急性 GVHD の対する治療成績：TRUMP データを用いた解析. 第 34 回日本造血細胞移植学会総会 2012 年 2 月 於：大阪.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

### 2. 学会発表

- 1) Kato T, Murata M, et al. Exhaustion of cytomegalovirus specific T cells after allogeneic stem cell transplantation. 第 73 回日本血液学会総会 2011 年 10 月 於：名古屋.
- 2) Kato T, Murata M, et al. Leukemia Escape From HLA-Specific T Lymphocyte Pressure in a Recipient of HLA One Locus-Mismatched Bone Marrow Transplantation. The 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, in San Diego, California. December 2011.

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療 研究事業）  
分担研究報告書

新しい骨髄採取方法（灌流法）のメリットと問題点

分担研究者 森 眞一郎（関西医科大学 第一内科，同附属枚方病院血液腫瘍内科）  
研究協力者 野村 昌作（関西医科大学 第一内科，同附属枚方病院血液腫瘍内科）

研究要旨

我々は、新しい骨髄移植の方法として、主としてカニクイザルを用いて灌流法+骨髄内骨髄移植方法を開発した。

ヒトへの応用に向けて Phase I Study を開始して来たが、今回、灌流法だけに焦点をあてて、安全性と有用性を明らかにするための臨床プロトコールを作成したので紹介し、今後の問題点を明らかにしたい。

A. 研究目的

灌流法開発までの経緯：マウス，ウサギ，カニクイザル，ヒトに至る、我々のデータを紹介する。

B. 研究方法

対象：HLA 適合または GVH 方向血清 3 抗原以内不適合血縁者。適格条件、除外条件については、非血縁バンクドナーの基準に準ずる。

方法：全身麻酔下にて吸引法（従来法）を実施する前に片側腸骨から灌流法で骨髄採取する。2本の骨髄穿刺針を腸骨に約 3~5cm の間隔で穿刺し、生理食塩水 30ml を一方よりゆっくり注入し、同時に対側から軽く吸引する。この時、採取側シリンジには、ヘパリン（10~30U/ml とする）加生理食塩液（約 0.5ml）を使用する。灌流法による骨髄採取が終了後、従来法である吸引法を用いて必要細胞数に達するまで骨髄採取を継続する。

C. 研究結果

灌流法のメリット

- ①骨髄穿刺針の刺入個所の数が少なくて済む（200 個所→8 個所）。
- ②従って、出血が少なく、輸血が不要である。

③短時間で完了できるため、麻酔の時間が短縮される（導尿が不要）。

④痛みが少ないため、翌日までに帰宅ができる。

⑤出血が少ないため、末梢血の混入が少なく、赤血球の除去の必要もない。さらに T 細胞の混入も少ないので、T 細胞を除去しなくても GvHD が発症しにくい。

D. 考察

正常ドナーの全骨髄細胞(HSC や MSC を含む)をレシピエントへ移植することにより、種々の難病が治療可能となる。

E. 結論

灌流法の問題点

- ①総細胞数 …  $3 \times 10^8/\text{kg}$  以上採取可能か？
- ②CD34+細胞の数… $1 \times 10^6/\text{kg}$  以上
- ③CD3+細胞の数…GvHR vs HvGR (Rejection)には 10%以上の T 細胞
- ④MSC の数… Culture (after PM or AM)
- ⑤整形外科医の Help … Orientation of iliac bone (CT)と骨皮質の厚さ
- ⑥赤血球の除去… HES
- ⑦Donor の年齢…20 代, 30 代, 40 代, 50 代

- ⑧採取場所：腸骨，長管骨
- ⑨体重（肥満），筋肉質
- ⑩骨髓穿刺針の穿刺個所の数と深さ…順方向と逆方向
- ⑪自己血・保存の必要性
- ⑫麻酔時間の短縮…導尿が不要
- ⑬採取器具（ドリル付骨髓穿刺針等）の開発

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Mori S, Fujita S, Yamamoto Y, Li M, Fukuhara S, Nomura S, and Ikehara S. Perfusion method for bone marrow cell collection in poor mobilizer lymphoma patient. *Int. J. Hematol.* 93: 822-824, 2011.



厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療 研究事業）  
分担研究報告書

－整形外科医からみた“灌流法の実際”－

研究協力者 串田 剛俊、飯田 寛和（関西医科大学 整形外科学講座）  
分担研究者 森 眞一郎（関西医科大学 第一内科，同附属枚方病院血液腫瘍内科）  
研究協力者 野村 昌作（関西医科大学 第一内科，同附属枚方病院血液腫瘍内科）  
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）

**研究要旨**

従来の骨髄採取方法（吸引法）はドナーの腸骨を 100 回以上穿刺するため負担が多い。また、採取された骨髄細胞には末梢血中リンパ球の混入が多くみとめられ、処理が必要となる。これに対し、池原らが開発した灌流法は長管骨または扁平骨に骨髄穿刺針を 2 本穿刺し、一方より生理食塩水を加え、他方より骨髄液を採取する方法である。この方法では穿刺数が少なく、末梢血の混入も抑制することが可能な方法である。

**A. 研究目的**

今回、整形外科医からみた骨髄内への穿刺方法や、より安全に挿入するための手術器具などの点から灌流法について検討した。

（20-30mm 程度）が必要ではないかと考えられる（図 2）。

**B. 研究方法**

**【骨膜刺激症状】**

腸骨を覆う骨膜には血管と知覚神経が豊富にある。整形外科手術において腸骨からの採骨後に局所疼痛が長期にわたり残存することがある。吸引法は多数回の腸骨への穿刺を行うため、骨膜周囲の血腫や知覚神経損傷をきたす可能性がある。一方、灌流法では穿刺回数が少なく、ドナーの負担が軽減される。

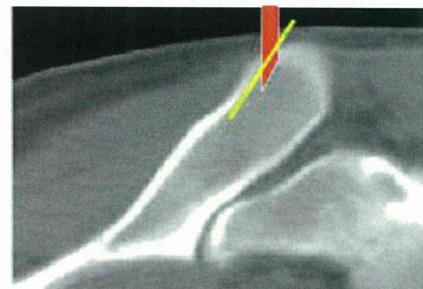


図 1 吸引法の穿刺針の深さ

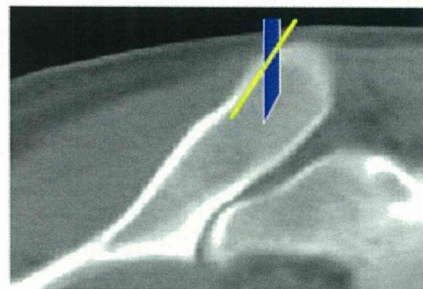


図 2 灌流法の穿刺針の深さ

**C. 研究結果**

**【穿刺の方向と深さ】**

**1) 吸引法と灌流法の穿刺針の深さの違い**

吸引法において、骨髄穿刺針は骨髄腔内にわずかに入れば（5-10mm 程度）、骨髄の採取可能である（図 1）。一方、灌流法においては、髄腔内を灌流液で灌流するため、骨髄穿刺針はある程度の深さ

**2) 吸引法と灌流法の穿刺針の穿刺方向の違い**

ドナーが腹臥位になった際、腸骨稜内の傾きは水平面に対し、約 60 度傾いており、髄腔内に 2-3cm

挿入使用とした際、穿刺する部位により骨髄穿刺針を傾ける必要がある（図3、4）。



図3 腸骨翼の傾き

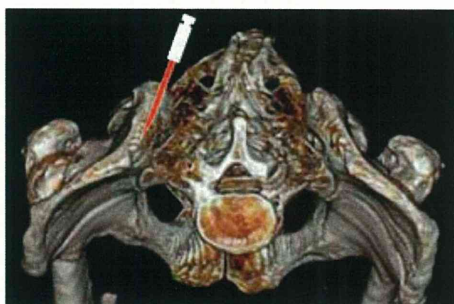


図4 骨髄穿刺針の傾き

## D. 考察

### 【様々な装置を用いた穿刺方法】

#### 1) ポータブル透視装置

主に骨折の手術に用いる透視装置である。X線により骨折の整復および固定状況がリアルタイムに把握できる。利点として、ポータブルタイプのため様々な場所に移動が可能であり、透視装置の角度を変えることにより被写体を動かすことなく360度回転が可能である。

腸骨への骨髄穿刺針の刺入時、肥満な症例や筋肉質の症例では腸骨翼の角度が把握しにくいいため、腸骨骨髄内への針刺入が困難な場合がある。ポータブル透視装置を用いれば、針刺入の角度や刺入距離など正確に把握できる。

#### 2) CTガイド

CTガイド下に脊椎内や骨盤内の骨生検査を行っている。また、脊椎圧迫骨折時にCTガイド下に椎体内に骨セメントを注入している。いずれも清潔操

作で行っており、腸骨への骨髄穿刺にも応用が可能である。ポータブル透視装置より、正確に骨髄腔内に穿刺が可能である。

#### 3) ナビゲーションシステム

ポータブル透視装置やCTは術中に放射線を使用するデメリットがある。これに対し、ナビゲーションシステムは赤外線を利用して、リアルタイムでモニター上に表示することが可能な装置である。特に、脳外科の手術で多く用いられているが、整形外科分野では脊椎後方固定時にスクリューの挿入に用いられる。

この方法は、骨髄採取においてドナーの放射線被曝が無く、また、安全に骨髄穿刺針を骨盤内に刺入することが可能であり、利用効果が高いと考えられる。

## E. 結論

整形外科分野では骨・骨髄への穿刺・挿入方法において、様々な工夫がなされている。骨盤への骨髄穿刺においても、従来の穿刺方法に改良を加えることにより、骨髄腔を利用した灌流法が、より簡便かつ確実に行うことが可能と考えられる。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療 研究事業）  
分担研究報告書

新しい造血幹細胞移植技術評価のための、  
新規移植後モニタリングシステムの開発に関する研究

分担研究者 森尾 友宏（東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野 准教授）

研究協力者 清水 則夫（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・ウイルス治療学 准教授）

研究要旨

造血細胞移植技術を評価するための、簡便かつ高感度な微生物モニタリングシステム、免疫学的再構築評価システムを構築し、実際の造血細胞移植後検体を用いて解析した。B・T 細胞の新生能は移植後の免疫学的再構築を鋭敏に反映し、また拒絶や移植後の予後とも関連があることが示唆された。今後はより安定した測定系とするために、全自動化に向けた取組みを行っている。

A. 研究目的

造血細胞移植においては、原疾患の再発に加えて、早期・晩期拒絶、混合キメリズム、GVHD、感染症、長期的免疫不全症、晩期合併症など様々な問題を抱えている。骨髄内造血細胞移植などの新しい造血幹細胞移植技術はこれらの問題を回避し、より効果的かつ安全な移植方法を開発しようとするものであるが、その効果及び安全性を多角的にかつ科学的に検証するシステムが死活的に重要である。本研究は、骨髄内造血細胞移植における免疫学的再構築や移植後合併症の詳細かつ簡便な解析法を開発することを目的として行われた。具体的には、今まで行われてきた一般的な微生物測定方法や免疫能評価方法に加えた高感度かつ簡便な検査方法を構築し、検証することを目的とした。

B. 研究方法

1) 対象は今までに東京医科歯科大学及び協力施設にて行われた造血細胞移植検体とした。

具体的には 80 名(移植時年齢 4 ヶ月～64 歳)、225 検体（移植後 6 日～601 日）を用いた。

疾患としては、急性白血病 38 症例、先天性免疫不全症 15 症例、慢性活動性 EBV 感染症 12

症例、固形腫瘍 5 症例、先天性代謝異常症 2 症例、先天性造血不全 2 症例、その他 6 症例であり、骨髄移植 52、臍帯血移植 20、末梢血幹細胞移植 8 であった。

2) 微生物測定は以下のものを対象とし、全自動化の試みに着手した。HSV1, HSV2, VZV, EBV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8, BKV, JCV, ParvovirusB19, Adenovirus, 16SrRNA (細菌共通), 18SrRNA (真菌共通) 3) 免疫モニタリングは以下の検討を行った。

3-1) T cell receptor excision circles (TREC) 及び Kappa-deleting recombination excision circles (KREC): 共に realtime PCR。KRECs については sjKRECs (B 細胞新生能を反映) と cjKRECs (B 細胞数を反映) の両者を用いたが、結果の検討は主に sjKRECs を用いて行った。

3-2) Multi-parameter (10-color) FACS analysis: flow cytometer。患者からはヘパリン加採血検体から FACS 解析用の細胞を分離し、また EDTA-2Na 保存全血から核酸を分離して、解析を行った。

本解析は東京医科歯科大学医学部倫理審査委

員会の承認を得て、患者への説明と同意のもとで実施された。

### C. 研究結果

- 1) 微生物モニタリングシステムについては、固相化 96 穴プレートを用いた realtime PCR 系を用い、記載した微生物及びスクリーニング産物の同定がほぼ確実にできることを確認した。一部のヘルペス属ウイルスについては 102 copy/□gDNA レベルで検出不能の検体を認めた。本システムについては核酸抽出から結果解析まで行う「全自動ロボット」への移行を検討した。
- 2) 免疫モニタリングシステムについては KRECs, TRECs 測定検体が 255 検体となった。KRECs, TRECs では標準化に取り組み、1 細胞に 1 コピーとなる plasmid が組み込まれた細胞株を用いて (Erasmus 大学 van Dongen 博士供与)、標準曲線を作成した。KRECs, TRECs が 180 日以降にも低値で推移する症例群では予後が悪い傾向にあった。また KRECs, TRECs の乖離がある症例が認められた。KRECs については sjKRECs が低値で cjKRECs が正常である検体があり、おそらく B 細胞が分裂することによりその数を維持しているものと予想される。
- 3) 10 parameter 免疫解析システムについては、LSR Fortessa を用いて、B サブセット(transitional B, naïve B, IgM memory, switched memory B, plasma blast, plasma cells)、T サブセット (Th subset, Treg, naïve, memory など)、NK, NKT, mDC, pDC などを解析できる抗体の組み合わせを確立した。

### D. 考察

微生物モニタリングシステムはより多くの微生物を短時間に高感度かつ比較的安価に行えるものであり、新規造血細胞移植技術の検証には最適な方法であると考えている。一方、一部のヘルペスウイルスについては、頻度が低いものの、102 copy/□gDNA レベルのウイルスを定性検査で検出できないことが

ある。感度としては十分であるが、検体そのものあるいは核酸抽出段階の問題であることまで確定しつつある。いずれにせよ、次年度以降には全自動化により試薬をパッケージとして提供できることも可能な状態にまで至っている。

T 細胞新生能、B 細胞新生能、免疫担当細胞亜群解析 (及び機能解析) により深い免疫能が解析できることが明らかになった。特に TRECs や sjKRECs は拒絶や免疫能回復の早期マーカーになる可能性がある。臍帯血移植において、sjKRECs, TRECs の値が高値である傾向も認められたが、移植患者の年齢などさらにパラメータを増やしての解析が重要である。

今回の検討では、非血縁間骨髄移植、臍帯血移植、末梢血幹細胞移植のみを対象とし、また開発を中心とした検討となっているが、今後骨髄内造血細胞移植が行われるようになれば、これらの手法を用いて、本移植法の利点と弱点を明らかにしつつ、利点をのばし、欠点を克服する手法を開発することが可能になると思われる。今年度の研究によって、骨髄内造血細胞移植実施に向けて、造血細胞移植後の微生物感染症と免疫能を詳細に検討する系を開発し、それらの系が実稼働することが確認された。

### E. 結論

移植後微生物モニタリングシステムや、高感度 B 細胞・T 細胞新生能検出システムの全自動化に着手した。骨髄内造血細胞移植実施に際しては、合併症や免疫学的再構築の詳細なモニタリングが可能である。

### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Morio T. Atsuta Y. Tomizawa D. Nagamura-Inoue T. Kato K. Ariga T. Kawa K. Koike K. Tauchi H.