

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

研究分担者 森尾友宏 東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野 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

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、混合キメラリズム、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 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。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 (TRECs) 及びKappa-deleting recombination excision circles (KRECs) 共にrealtime PCR3-2) 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. 結果

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 10^2 copy/ μ 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。免疫モニタリングシステムについては KRECs, TRECs 測定検体が 100 以上となった。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。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 E. 結論

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、 10^2 copy/ μ 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。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、利点をのぼし、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。

「制御性T細胞治療による
臨床肝移植における
免疫寛容誘導法の開発」
に関する研究

「制御性 T 細胞治療による臨床肝移植における免疫寛容誘導法の開発」に関する研究

研究代表者	藤堂 省 北海道大学・大学院医学研究科・移植外科講座・教授
研究分担者	奥村 康 (順天堂大学大学院医学研究科、アトピー疾患研究センター、教授) 垣生 園子 (順天堂大学医学部、免疫学講座、教授) 寺岡 慧 (国際医療福祉大学 熱海病院、病院長) 場集田 寿 (順天堂大学医学部、免疫学講座、助教) 山下 健一郎 (北海道大学大学院医学研究科、移植外科学講座、准教授) 清野 研一郎 (北海道大学遺伝子病制御研究所、病態研究部門、教授) 上本 伸二 (京都大学大学院医学研究科、移植外科講座、教授)

A. 研究目的

肝臓移植患者は拒絶反応制御の為に、免疫抑制剤を生体服用しなければならず、副作用等の危険性に常に晒される。免疫抑制剤を軽減させる、或るいわ究極的には免疫寛容の誘導が必須である。本研究は生体肝移植患者を対象とし、ドナー抗原特異的な制御性T細胞を用いた細胞治療により、より安全で確実な免疫抑制軽減および免疫寛容誘導法の確立を目的とする。

B. 方法

対象：成人生体肝移植レシピエントおよびドナー。

制御性T細胞のex vivo誘導：レシピエントおよびドナーより成分採血法にて採取した末梢単核球細胞 (PBMC) を、症例4以降はレシピエント脾細胞も、抗CD80抗体および抗CD86抗体存在下に2週間共培養し制御性T細胞を誘導する。培養細胞中の制御性T細胞 (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺、CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺、CD4⁺CD127^{lo} Foxp3⁺細胞など) の割合をFACSにて解析し、免疫抑制能をMLR法にて検討する。

培養制御性T細胞を用いた免疫抑制療法：生体ドナーの肝グラフト採取術、肝移植術、ならびに術後管理は標準的術式と術後管理法に準じる。なお、免疫抑制療法はプログラフ(TAC)、セルセプト(MMF)、ステロイドの3剤併用で、ステロイドは再灌流時-1000 mg、術翌日からは20 mg/dayを投与。MMFは移植手術翌日から 500 mg/dayを内服開始し、1週間後より必要に応じて1000~2000 mg/dayまで増量。TACは移植後より投与 (1日2回) 開始し、血中トラフ濃度を術後早期は8-12 ng/mlで、術後3ヶ月以降は6-8 ng/mlで維持。サイクロフォスファミド(CPA)を術後4日目に投与し、培養リンパ球 (制御性T細胞) を術後13日目に輸注。定期的に血液生化学検査や免疫学的検査および肝生検を行い、グラフト機能、拒絶反応の有無や免疫状態をモニタリングしつつ免疫抑制剤を段階的に減量。ステロイドは初期量から1週間毎5 mg/day減量し、術後5週目に中止。MMFは500 mg/dayずつ減量し、術後3ヶ月以内に中止。TACは1日2回投与を術後6ヶ月目より1日1回 (半量) とし、以降3ヶ月ごとに、1日おき、週3回、週2回、週1回投与へ漸減し、最終的に投与を中止する計画である。

C. 結果

(1) 制御性T細胞のex vivo誘導

抗 CD80 および抗 CD86 抗体存在下に放射線照射ドナーPBMC とレシピエント PBMC (+脾細胞) を2週間共培養すると総リンパ球数は開始時の $10.0 \pm 2.2 \times 10^9$ ($7.9 \sim 14.1 \times 10^9$) 個から2週間後には $1.4 \pm 0.9 \times 10^9$ ($0.6 \sim 2.5 \times 10^9$) 個へと減少した。一方、リンパ球の表現型解析では、CD3⁺CD4⁺細胞およびCD3⁺CD8⁺細胞は2週間培養により、各々 30.1 ± 9.5 ($19.0 \sim 48.0$)% から 63.4 ± 11.7 ($42.2 \sim 78.4$)% へ、 14.8 ± 9.1 ($1.6 \sim 27.5$)% から 21.6 ± 12.5 ($5.9 \sim 43.5$)% へ増加した。また、制御性T細胞 (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞) は、 4.8 ± 1.9 ($2.4 \sim 7.5$)% から 19.0 ± 7.9 ($8.8 \sim 28.1$)% と、培養開始時に比べ2.7~8.8倍増加した。同様に、CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺細胞およ

び CD4⁺CD127^{lo} Foxp3⁺細胞の割合も2週間培養で共に上昇した。この培養細胞を添加することにより、ドナー抗原に対するMLRは細胞数依存性的に抑制された。他方、第三者抗原に対する抑制は、ドナー抗原に比べ弱かった。

(2) 肝移植症例における培養制御性T細胞を用いた免疫抑制療法

臨床検体を用いた予備試験を経て、平成22年11月30日より現在までに生体肝移植患者7例において本治療法を施行した。

症例1，39歳、男性。C型肝硬変に対し弟の肝左葉グラフトを用いた。3剤で免疫抑制を開始し、術後4および5日目にCPA 25 mg/kgを投与した。肝機能は、術後7日目にはほぼ正常値まで復した。13日目に培養リンパ球を輸注したが、明らかな副作用は認めなかった。術後28日目にはTAC単剤での免疫抑制となった。細胞輸注後は末梢血中の制御性T細胞 (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺およびCD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺ T細胞) の割合は増加した。術後34日目よりCMV感染症のため、免疫抑制を完全に中止したが、術後65日目にAST/ALT値が軽度上昇し、肝生検にてmild ACRと診断され、TACによる免疫抑制を再開した。術後98日目の肝生検でC型肝炎再発が疑われ、インターフェロン・リバビリン治療を開始した。術後6ヶ月目よりTAC減量を開始。現在、術後約12ヶ月経過し、TAC 1.5 mg/dayの隔日投与で肝機能は安定している。

症例2，63歳、男性で、アルコール性肝硬変に対し、息子の肝左葉グラフトを用いた。本症例ではCPA投与によりWBCは400/mm³まで低下し、G-CSF投与が必要であった。術後11日目にMMFを中止し、13日目に培養リンパ球を輸注したが、明らかな副作用は認めなかった。末梢血液中の制御性T細胞が検討では全てのphenotype (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺、CD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺、CD4⁺CD45RA⁺Foxp3⁺) が上昇し、術後8-10週目まで術前値以上の割合が維持された。17日目にはTAC単剤での免疫抑制となった。術後20日目にAST/ALT値が軽度上昇し、肝生検ではmild ACRと診断された。ソルコーテフ投与により、拒絶反応は制御された。その後現在までに拒絶反応を認めず、術後約9ヶ月経過しているが、TAC 1.5 mg、1日1回 投与のみで肝機能は安定し、近日中に隔日投与への減量を予定している。

症例3，56歳、男性。NASH肝硬変に対し、息子の肝左葉グラフトを用いた。CPA投与によりWBCは1700/mm³まで低下した。術後13日目に培養リンパ球を輸注したが、WBCは6600/mm³であった。細胞輸注に伴う明らかな副作用は認められなかった。培養細胞輸注後、末梢血液中の制御性T細胞の割合が上昇した。TACは5-6 mg/day、trough 6-9 ng/mlで維持していたが、神経毒性の副作用が疑われ、術後20日目にステロイド単剤での免疫抑制に変更した。術後26日目よりAST/ALT値が軽度上昇し、肝生検で脂肪肝と診断された。ステロイドを術後30日目に中止し、CyA投与に切り替えた。現在、術後8ヶ月半経過し、肝機能は安定している。免疫抑制はCsA単剤 (150 mg 1日1回 投与、trough 60-70 ng/ml) で維持しており、今後、隔日投与への減量を予定している。

症例4，59歳、男性。B型肝硬変+HCCに対し、息子 (義理) の肝左葉グラフトを用いた。術前より糖尿病性腎症があり、TAC腎障害のため術後6日目から透析導入となった。術後13日目に培養リンパ球を輸注した。細胞輸注に伴う明らかな副作用は認められなかった。術後25日目より鬱血性心不全を併発。TAC心毒性が懸念されたため、術後34日目よりMMF単剤 (1000 mg/day) で免疫抑制を維持した。術後37日目からラパマイシン(RAPA) 1 mg/dayを開始し、術後52日まで併用した。心機能安定したため、術後55日目からTACを再開、70日目にMMFを中止しTAC単剤での免疫抑制とした。この間、拒絶反応の兆候はなく、肝機能は良好に保たれた。培養細胞輸注後は末梢血液中CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺、CD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺、CD4⁺CD45RA⁺Foxp3⁺細胞の割合は上昇した。現在、術後5ヶ月経過し、TAC単剤 (2 mg/day、trough 6-8 ng/ml) で全身状態・肝機能共に安定している。

症例5，52歳、男性。PBCの診断で、兄の肝左葉グラフトを用いた。術後5日目にCPA 40 mg/kgを1回投与し、WBCは1200/mm³まで低下した。術後13日目に培養リンパ球を輸注した。CPA副作用である脱毛を認めたが、細胞輸注に伴う副作用は認められなかった。移植肝機能は良好で拒絶反応の兆候無く、術後17日目にMMFを、28日目にステロイドをそれぞれ中止し、現在TAC単剤 (5 mg/day、trough 8-10 ng/ml) で免疫抑制を行っている。

症例6，55歳、女性。PSCの診断で、娘の肝左葉グラフトを用いた生体肝移植術を施行した。術後13日目に培養リンパ球を輸注した。細胞輸注に伴う明らかな副作用は認められなかった。移植肝機能は良好で拒絶反応の兆候無く、術後17日目にMMFを、29日目にステロイドをそれぞれ中止し、現在TAC単剤 (5 mg/day、trough 8-10 ng/ml) で免疫抑制を行っている。

症例7, 59歳、女性。肝硬変 (NBNC) + HCCに対し、娘の肝左葉グラフトを用いた。現在、術後9日目で全身状態・移植肝機能は安定しており、13日目に培養リンパ球の輸注を予定している。

D. 考察

成分採血法にて採取したレシピエント PMBC を抗 CD80 抗体および抗 CD86 抗体存在下にドナーPMBC と 2 週間共培養することで、ドナー抗原特異的な制御性 T 細胞が高率に誘導された。培養細胞の輸注に伴う副作用は全例で認められなかった。本臨床試験の 7 例中 2 例に、免疫抑制剤を早期に完全中止後及び、免疫抑制剤減量中に、mild な ACR を認めたのみである。現在、全例においてカルシニューリン阻害剤単独投与で良好な肝機能を維持しており、引き続き注意深い経過観察が必要であるが、今後、免疫抑制剤の漸減を計画している。

抗 CD80 および抗 CD86 抗体により誘導した制御性 T 細胞を輸注後から、全例において末梢血中の制御性 T 細胞 phenotype の割合が増加していた。これら制御性 T 細胞が細胞輸注後どの程度の期間維持され、免疫寛容誘導に寄与するかは今後さらなる検討と各症例の経過を観察する必要がある。

E. 結論

肝移植症例 7 例において、制御性 T 細胞を用いた新しい免疫抑制療法の臨床試験を施行した。抗 CD80 抗体および抗 CD86 抗体存在下に PMBC を共培養することで制御性 T 細胞は高率に誘導された。培養細胞輸注に伴う副作用を認めなかった。経過中、2 例で拒絶反応が認められたもののその程度は軽微であり、他の症例では拒絶反応を認めなかった。全例、TAC もしくは CsA 単剤による免疫抑制でグラフト機能は良好保たれ、現在 3 症例で免疫抑制剤を減量中である。本試験の効果判定には今後の経過観察と症例の追加が必要である。

卵膜由来間葉系幹細胞を用いた
難治性疾患に対する
新規移植再生療法の開発
に関する研究

卵膜由来間葉系幹細胞を用いた難治性疾患に対する新規移植再生療法の開発に関する研究

研究代表者 池田智明 三重大学医学部産科婦人科学・教授

研究分担者 高原史郎 大阪大学大学院医学系研究科・先端移植基盤医療学・教授

丸井晃 京都大学医学部附属病院・探索医療センター・准教授

大西俊介 北海道大学大学院医学研究科・消化器内科学分野・助教

山原研一 国立循環器病研究センター・再生医療部・室長

A 研究目的

近年、骨髄や脂肪組織などに存在する間葉系幹細胞 (MSC) を用いた再生医療応用研究が行われている。我々は以前から MSC の組織再生作用に着目し、難治性心筋梗塞モデルにおける脂肪 MSC 移植の治療効果を証明し (Nat Med 12 459-65, 2006)、更に、難治性心不全患者に対する自己骨髄 MSC 移植の臨床応用研究 (臨床試験登録 UMIN00000656) でその組織再生効果を確認している。しかしながら、自己骨髄 MSC の樹立は、1) その採取に侵襲を伴う、2) 移植細胞数を確保するための培養期間が必要、3) 重症患者あるいは骨髄疾患などの場合は不適、といった問題点がある。これら問題を解決すべく、我々は通常破棄され倫理的問題の少ない胎児付属物である卵膜から MSC の樹立に成功し、その移植による血管再生効果は骨髄由来 MSC に匹敵することを証明した (Stem cells 26 2625-33, 2008)。

一方、組織再生を目的とした研究が進んできた MSC 移植であるが、最近はその免疫調節作用が注目され、骨髄移植における GVHD 予防では臨床応用研究が開始されている (Lancet. 371 1579-86, 2008)。しかしながら、組織再生同様、骨髄 MSC を中心とした研究が主体であり、卵膜 MSC による免疫制御の可能性を考慮した研究は進んでいない。特に卵膜 MSC は他家移植が想定されるため、骨髄などの自己 MSC と比較し、ホスト側の免疫反応により治療効果が異なる可能性が考えられる。しかしながら、卵膜を含む胎児付属物は免疫原性が低いことから (Circulation 112 214-23, 2005)、他家卵膜 MSC 移植は自己骨髄 MSC 同様の免疫調節効果を示す可能性がある。実際我々は、心筋炎や腎炎モデルにおいて、自己骨髄 MSC のみならず、他家同種卵膜 MSC による移植治療効果を確認している (J Mol Cell Cardiol 49 753-61 2010, Am J Physiol Renal Physiol 299 F1004-13 2010)。

そこで、我々は、新たな細胞移植ソースである卵膜 MSC に着目し、1) その免疫調節作用を細胞レベルにて検証する、2) 研究分担者が得意とする各種難治性疾患モデルにおいて卵膜 MSC 移植による治療効果を免疫調節・炎症抑制の観点から検証し、各種難治性疾患に対する新規細胞移植療法開発を目指した基礎的研究を開始した。

B 方法

本年度は、卵膜 MSC 移植の臨床応用を目指した動物モデルを用いた研究、特にその治療効果やメカニズム解析に関する検討を行った。

①ラット自己免疫性心筋炎モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果検討

心筋炎モデルは雄 Lewis ラットにブタ心筋ミオシンを皮下注することで作成した。心筋炎初期のミオシン接種後 7 日目 (D7 群) や 10 日目 (D10 群)、および中期の 14 日目 (D14 群) に、MHC ハプロタイプ

が大きく異なる ACI ラット由来卵膜 MSC を 5×10^5 個経静脈的に移植した。心筋炎極期のミオシン接種後 21 日目に心機能評価や病理学的検討を、また、経時的に末梢血リンパ球の動態を検討した。

②ラット腎虚血再灌流モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果検討

ラット腎虚血再灌流モデルは、6 週齢雄 Lewis ラットの右腎を摘出後、左腎動脈を 60 分間結紮することにより作成した。再灌流時に MHC ハプロタイプが大きく異なる ACI ラット由来卵膜 MSC を 5×10^5 個経静脈的に移植した。その後、6, 12, 24 時間後に生化学的・病理学的評価、更に各種サイトカイン測定を行った。

③ラット肺高血圧症モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果検討

ラット肺高血圧モデルは、5 週齢雄 Wister ラットにモノクロタリン 60mg/kg を皮下注射し作成した。同時に Wister ラット由来卵膜 MSC を 5×10^5 個経静脈的に移植した。細胞移植は我々が開発した細胞分散フィルターを用いて行った。病態が完成する 25 日後に血行動態および病理学的評価を行った。

C 結果

①ラット自己免疫性心筋炎モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果検討

ラット心筋炎モデルにおける卵膜 MSC 移植による心機能改善は、全ての細胞移植群において認められたが、D7 群と比較し D10 群および D14 群においてその効果が顕著であった。末梢血ヘルパー T 細胞のうち Th1 細胞は 16 日目をピークとして増加していたが、卵膜 MSC 移植によりその増加の抑制が認められ、特に D10 群、D14 群ではその抑制が顕著であった。病理学的検討においても、心筋における CD68 陽性マクロファージ浸潤は細胞移植により、特に D10 群で抑制されていた。

②ラット腎虚血再灌流モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果検討

再灌流 12 時間後の血中クレアチニンは sham 群にて有意な増加を認め、その増加は卵膜 MSC 移植により改善した。その傾向は再灌流 24 時間後に顕著となり、血中尿素窒素およびクレアチニン両者とも卵膜 MSC 移植により有意な改善を認めた。再灌流 24 時間後における腎組織の TUNEL 染色では、卵膜 MSC 移植による有意なアポトーシス抑制を認めた。また、マクロファージマーカー ED-1 抗体を用いた腎組織の免疫組織学的染色において、再灌流 6, 12, 24 時間後における ED-1 陽性細胞の浸潤が、卵膜 MSC 移植により有意に抑制されていた。更に CD3 陽性 T 細胞浸潤も ED-1 同様、卵膜 MSC 移植はその浸潤を著明に抑制していた。腎実質における定量的 RT-PCR 解析では、腎虚血再灌流による MCP-1 や IL-6 といった炎症関連サイトカインの遺伝子発現の増加が、卵膜 MSC 移植により有意に抑制された。各種血中サイトカインを検討したところ、卵膜 MSC 移植により抗炎症性サイトカインである IL-10 の増加を認めた。そこで、卵膜 MSC 移植に抗 IL-10 抗体を併用して腎虚血再灌流を行ったところ、卵膜 MSC 移植による腎機能改善効果の減弱を認めた。

③ラット肺高血圧症モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果検討

ラットに MSC を経静脈的に移植すると、かなりの割合の細胞が肺にトラップされる。一度に大量の MSC を移植すると肺塞栓をおこし、死に至る。これは、MSC は接着性細胞であることから、懸濁時に細胞凝集塊を形成していることが原因と間が江良得る。そこで、我々が開発した透析用中空糸を用いた細胞分散フィルターを用いたところ、MSC はフィルター通過によりバラバラの状態になることを確認した。実際フィルターを用いることで、MSC 静注による肺塞栓発症が抑制できること、移植された MSC が肺全体に分散していることを、蛍光ラベルした細胞を用いることにより確認した。

25日目における肺高血圧症モデルラットの血行動態解析では、右心室圧が80mmHgまで上昇していたが、卵膜MSC移植により60mmHgにまで有意に低下した。同様に右室重量も肺高血圧により有意に増加したが、その増加は卵膜MSC移植により著明に減少した。病理組織学的検討では、肺高血圧による血管壁の著明な肥厚が卵膜MSC移植により有意に改善していた。

D 考察

MSCに関し、これまではその細胞移植による組織再生効果が研究されてきたが、近年MSC移植は骨髄移植後のGVHDやクローン病など、免疫破綻を伴う難治性疾患に対する新たな治療法として報告され、患者の免疫寛容・炎症抑制を誘導することが注目されている。通常MSCは骨髄由来が用いられており、免疫制御に関しても骨髄由来MSCを用いた報告が多いが、その採取は侵襲を伴い、また移植細胞数を確保するには一定の培養期間が必要であり、また重症患者や骨髄疾患などの場合は不相当といった問題点がある。そこで、我々は通常破棄されることから倫理的問題が少ない卵膜に着目し、卵膜からMSCが樹立できること、一度に大量のMSCを確保できることを証明してきた。今年度の研究成果からは、各種難治性疾患に対する卵膜MSC移植が、組織保護・免疫・炎症調節作用を有することが明らかとなった。特に今年度行った自己免疫性心筋炎・腎虚血再還流などの炎症性疾患に対する卵膜MSC移植は、他家移植であっても著明な炎症抑制作用を有していることが明らかとなった。

今後、心再還流モデル、対外循環モデル、大動脈解離モデル、好酸球性食道炎・放射線性消化管粘膜障害モデルなどの他の難治性疾患において、卵膜MSC移植による治療効果検証を行う。また、ヒト卵膜MSCの臨床応用には他家移植であることから、迅速な細胞移植のための細胞バンク化を目指した検討を行う。即ち、各種難治性疾患に対する卵膜MSC移植のデータから得られた移植免疫評価の結果から、どの程度のHLAミスマッチが許されるかを推測し、細胞バンクの規模を検証する。我々はヒト卵膜からもMSCを樹立し、一人の卵膜から常に数千人分に対し移植可能な細胞数を確保することに成功しており、卵膜MSCバンクができればオンデマンドで細胞移植治療が可能になり、疾患の状態にかかわらず、より多くの患者に細胞治療が応用できると考えている。

E 結論

今年度の研究から、心筋炎、腎虚血、肺高血圧と行った難治性病態において卵膜MSC移植が治療効果を示すことが明らかとなった。MSC移植による治療効果は、従来考えられていた組織再生よりも、組織保護、免疫制御、抗炎症効果である可能性が高く、今後他の難治性疾患モデルを含めて治療効果メカニズム検証を継続していく。

我々がこれまで報告してきた卵膜MSCのメリットは、骨髄MSCと比較して倫理的問題が少なく、非侵襲的に大量の細胞を得られることである。我々は卵膜MSC移植が組織保護のみならず、免疫破綻や炎症疾患を含む難治性疾患に対する安全・普遍的・効果的な新規移植療法となりうると考えており、今後も卵膜MSC移植の臨床応用を目指した前臨床研究を推進していきたい。

より安全で良質な同種骨を
供給するための
社会基盤整備

より安全で良質な同種骨を供給するための社会基盤整備

研究代表者	糸満盛憲	北里大学・名誉教授 九州労災病院・院長
研究分担者	水田博志 神宮司誠也 長谷川幸治	熊本大学大学院生命科学研究部運動骨格病態学分野・教授 九州労災病院整形外科・部長・副院長 名古屋大学大学院医学系研究科機能構築医学専攻運動形態外科学・准教授
研究協力者	蜂谷裕道 占部 憲	医療法人蜂友会はちや整形外科病院・院長 東海骨バンク・理事長 津久井赤十字病院整形外科・膝関節センター・部長・センター長

A 研究目的

近年、人工関節置換術後の骨融解によるゆるみに対する再置換術が増加しているため、これに伴って同種骨移植の需要が年々増加している。国内では骨バンクネットワークが整備されていないため、200以上の病院において自施設で生体ドナーから手術時に採取された大腿骨頭を保存して移植に利用する施設内骨バンクを運営しているが、必ずしも安全性が確保されているとは言い難い。本研究の目的は、より安全で良質の同種骨を安定供給するための社会基盤整備を目指して、我が国における同種骨移植の現状の調査から問題点を明らかにし、その解決策を提示することである。

B 方法

- ① ボーンバンクネットワーク構築に向けたシミュレーション（水田博志）：平成22年度に行った、日本整形外科学会（日整会）による、5年毎の整形外科領域における組織移植の現状調査結果の解析の結果に基づいて、全国規模のボーンバンクネットワーク構築に向けたシミュレーションを熊本大学整形外科を中心に行った。熊本大学整形外科内に同種骨採取チームを編成し、骨採取機器を整備し、非生体ドナーからの骨採取に必要な教育を実施する。ドナー発生時の体制について熊本地区の移植Coと協議し、拠点バンクとなる東海骨バンクとの連絡体制、採取骨の搬送方法などについて協議し、実際にドナー発生時に向けて準備を進める。
- ② 同種骨移植の細菌学的問題及び医療保険上の取り扱いおよび全国規模の骨バンクネットワーク構築に関するアンケート調査（神宮司誠也）：日整会認定研修施設を対象に、同種骨移植の細菌検査の有無とタイミング、移植後の感染発生の有無、切除大腿骨頭移植の診療報酬請求の有無について調査した。また全国の大学整形外科を対象に、全国規模のボーンバンクネットワークの構築に関して調査を行った。
- ③ 我が国における組織移植の現状（蜂谷裕道）：日本組織移植学会の登録結果に基づいて、皮膚、心臓弁・血管および骨・靭帯などの組織移植の現状を解析した。
- ④ バーコードシステム同種骨管理システムの有効性（長谷川幸治）：骨バンクネットワーク東海では生体ドナー大腿骨頭を集積し、個人情報の保護、骨の提供・供給体制、管理体制、トレーサビリティなどの問題を解決するためにバーコードシステムを導入した。その問題点を明らかにするために、各段階の問題点を検討した。
- ⑤ 先進医療による同種骨・靭帯組織移植の現状と問題点（占部 憲）：先進医療を行う施設として厚生労働省によって認定された、北里大学病院骨バンクと東海骨バンクの2施設における2007～2010年の先進医療の実績、同時期に他施設に SHIPPINGされた件数、組織の数およびその内容について調査し、問題点を検討した。

C 結果

- ① 日整会による整形外科領域における組織移植の現状調査結果を解析した結果、同種骨移植総数は年度ごとに増加し、この間施設内骨バンクも210施設に増加していた。切除大腿骨頭の感染症の検査は、通常の術前検査で行われる範囲の検査は100%に行われていたが、日本組織移植学会、日整会がガイドライン

で示している HIV 検査は 73%、HTLV-1 は 50%、血液培養 25%、パルボウイルス B19 抗体 2%、採取組織の細菌培養は 52%で実施されているのみであった。採取組織の加温処理が 69%、薬液処理が 18%の施設で行われていた。同種組織を用いることに関する倫理委員会の審査済みの施設は 48%に留まり、審査中ないし準備中 33%、審査の予定なし 22%であった。

熊本大学整形外科医師による採取チーム（3-4名）を2チーム編成し、日整会で作成されたガイドライン、骨採取の実際（DVD）に基づいて教育プログラムを実施した。また西村 Co（熊本赤十字病院）と非生体ドナー発生時の対応について、蜂谷医師（東海骨バンク）と採取チームの対応について詳細を協議し、今年度中に東海骨バンクとの共同シミュレーションを行う予定である。

- ② 同種骨移植の細菌学的検査および医療保険上の取り扱いおよびボーンバンクネットワークの構築に関するアンケート調査の結果、採取組織の細菌学的検査を行っている施設は 61%に過ぎず、同種組織移植後に細菌感染を経験した施設は 10.9%、感染症の追跡調査をしている施設は 41%に留まった。これらの施設内骨バンクは、日本組織移植学会の「ヒト組織を利用する医療行為の安全性確保・保存・使用に関するガイドライン」に準拠していないにもかかわらず、76.6%の施設で切除大腿骨頭を用いた同種骨移植術を診療報酬請求していた。

一方、全国規模のボーンバンクネットワークの構築に関しては、89%の施設が関心はあるが、24 時間体制で骨採取チームが編成できる施設は 11 施設（12.7%）に留まった。しかし自施設でドナーが発生した場合には採取可能とする施設は 71%であり、62%の施設では採取組織を一時保存する -80° 冷凍庫を保有していた。

- ③ 我が国における組織移植の現状 2010 年組織移植学会に登録された各分野の組織提供に至ったドナー数は、心臓弁・血管 6 例、皮膚 24 例、骨 6 例であり、レシピエント数は、各々 46 例、24 例 103 例であった。また 2010 年改正臓器移植法施行前後の脳死からの臓器提供は 3 例から 29 例と大幅に増加し、そのうち 18 例は組織の提供まで至ったが、骨の提供はなかった。
- ④ バーコードシステムによる生体ドナー同種大腿骨頭管理 個人情報の保護、骨の提供・供給体制、管理体制など管理上の問題はバーコードシステムの導入で解決されたが、トレーサビリティ、Fax によるバーコードの画質の低下などの問題点などが明らかになった。
- ⑥ 先進医療による同種骨・靭帯組織移植の現状と問題点 先進医療による同種骨移植症例は 331 例であり、主な対象疾患は脊椎疾患、人工関節、骨腫瘍、偽関節などであった。移植に用いられた骨の種類は腸骨 181 個、大腿骨や脛骨顆部（海綿骨ブロック）125 個、短い皮質骨ブロック 30 個、大腿骨頭 18 個、長い節状骨 10 個および膝蓋腱 7 個であった。同時期に他施設に SHIPPING された例数は 491 例、骨の総数は 597 個であった。内訳は腸骨 209 個、海綿骨ブロック 123 個、骨幹部皮質骨 109、個皮質骨ブロック 27 個などが多く、その他大腿骨頭、顔面骨チップ、膝蓋腱など腱・靭帯がおのおの 96 個、26 個、7 個であった。これらの検討の結果、組織移植の対象になる病態によって必要な組織の量やサイズが異なるにもかかわらず先進医療で認可された費用は一定である。他施設に SHIPPING された組織の総数が先進医療で用いられた数を上回ることから、同種骨の需要が増加していることは明らかで、現状ではこれら SHIPPING された組織の処理・保存に要する費用は請求できない。

D 考察

日整会の 5 年毎の調査結果の分析から、同種骨移植件数は年々増加し、近年その対象疾患の 50%以上が人工関節手術になっており、高齢化に伴って人工関節が多用され同種骨移植を必要とする再置換術が増加していることを示している。このような需要の増加に伴って、施設内骨バンクの数も増加している。しかしこれらの施設内骨バンクは日整会および組織移植学会のガイドラインを必ずしも遵守して運営されてなく、HIV（73%）、HTLV-1（50%）、パルボウイルス B1（2%）などの感染症検査が不十分である。採取組織の細菌検査は 52%の施設で行われているのみであり、安全性が担保されているとは言い難い。また同種組織移植を行っているにもかかわらず施設内の倫理委員会の審査済みの施設は 48%に過ぎなかった。

本研究で行った日整会認定研修施設に対するアンケート調査の結果、採取組織の細菌学的検査を行っている施設は 61%に過ぎず、同種組織移植後に細菌感染を経験した施設は 10.9%にのぼり、同種骨移植後の感染

症に対する追跡調査も41%で行われているに過ぎなかった。このように自施設で用いるために生体ドナーから採取した同種骨を保存している施設では、必ずしも安全性が確保されていないことが明らかになった。この結果は、小さな大腿骨頭に対する採取組織の細菌学的検査を含めた、感染症検査を徹底する手順の煩雑さ、その際に要する費用の負担などにも問題があるものと思われた。しかし、平成22年度版、医科点数表の解釈・K059(5)に、同種骨(凍結保存された死体骨を含む)を移植する場合においては、「日本組織移植学会が作成した「ヒト組織を利用する医療行為の安全性確保・保存・使用に関するガイドライン」を遵守した場合に限り算定する」と規定されているにもかかわらず、76.6%の施設で切除大腿骨頭を用いた同種骨移植術を診療報酬請求していたことは問題である。生体ドナー由来の切除大腿骨頭の安全性を確保する目的で設立された骨バンクネットワーク東海では、バーコードシステムを導入することによって個人情報の守秘化、骨の提供・供給など管理上の問題を解決しているが、このネットワークも日本組織移植学会の認定を受けていないため、供給された同種骨を移植に利用しても診療報酬は算定できない。

現在同種骨・靭帯移植は先進医療に認定されて行われている。しかし、認定バンクは全国に2施設のみであり、2007~2010年に同2施設で行われた同種移植は331例である。これらはサイズや形が異なる骨が使われるにも関わらず、先進医療で認定された費用は一定である。一方、同時期に他施設に SHIPPING されて移植されたのは491例と、先進医療実施施設で用いられた例よりも多い。特に SHIPPING された同種骨は、骨幹部皮質骨、皮質骨ブロックなどがかなりの数に上っており、この種の同種骨は非生体ドナーから採取した骨でのみ利用可能である。組織移植学会のガイドラインを遵守して運営されているこの2つのバンクから供給される同種組織の安全性は高いため、SHIPPING 依頼が年々増加傾向にある。認定バンクから供給された組織を移植した場合、その施設では「同種骨移植術」を算定できるが、その処理・保存に要する費用をバンクで請求することができないなど、不合理な点がある。また組織の採取もこの2施設のみで行われているため地域的な制約が大きく、保存組織が減少し、移植施設からの要求に見合ったサイズや性状の組織を常時供給できるとは限らないのが現状である。

臓器移植ネットワーク、組織移植ネットワークの連携によって、近年組織のドナーも増加傾向にあるが、骨の提供に至るケースはまだ少ない。2010年改正臓器移植法施行前後の脳死からの臓器提供は3例から29例と大幅に増加し、そのうち18例は組織の提供まで至ったが、骨の提供はなかった。

安全で良質の同種骨を安定供給するためには、現在活動している2つの拠点バンクを中心に、全国で非生体ドナーから同種組織を採取するチームを立ち上げ、ドナー数を確保することが最低限要求される。同種骨移植の必要性が増加していることから、全国規模のポーンバンクネットワークの構築に関しては、多くの施設が理解を示しているが、24時間体制で骨採取チームが編成できる施設は必ずしも多くはない。多忙な日常診療活動の中で採取チームを編成し24時間対応することの難しさを示すものである。しかし71%の施設では自施設で発生したドナーには対応可能としており、62%の施設では採取組織を一時保存する-80℃冷凍庫を保有していることから、上記2施設を拠点バンクとしてかなりの範囲で非生体ドナーからの組織採取が行われる可能性があることが明らかになった。今後これらの施設との連携を強化し、ポーンバンクネットワークを確立していきたい。東海骨バンクと熊本大学の協力によってシミュレーションが始められているが、全国規模のネットワーク構築に向けたモデルとしてその意義は大きい。

E 結論

同種骨移植に対する需要が年々増加傾向にあるため、生体ドナーから採取された大腿骨頭を保存して自施設で利用する施設内骨バンクが増加しているが、必ずしも安全性が確保されているとは言いがたい。日本組織移植学会が認定する骨バンクは2施設しかなく、非生体ドナーへの対応可能な範囲が限られているため、他施設からの同種組織の需要に対応できない。全国的に採取チームを形成しネットワークを立ち上げてドナー数を増やし、この2つの拠点バンクで処理・保存するシステムを構築することで安全な同種骨・靭帯組織を安定供給することが可能となる。その際、SHIPPING される同種組織の処理・保存に要した費用に対する配慮が必要である。

ボーンバンクネットワーク構築に向けたシミュレーション

研究分担者 水田博志 熊本大学大学院生命科学研究部運動骨格病態学分野教授
研究協力者 蜂谷裕道 はちや整形外科病院・院長 東海骨バンク・理事長

A 研究目的

高齢者の関節や脊椎の手術が増加し、同種骨の需要が急増しており、その供給には非生体ドナーからの骨採取が必要不可欠である。非生体ドナーから骨を取り扱う地域骨バンクは北里大学病院骨バンクと東海骨バンクだけであり、この2施設だけで同種骨を採取するだけでは全国の需要に対応することはできない。需要と供給の不均衡を是正し、より安全で良質の骨を供給するためには、この2施設を東西の拠点バンクとした全国規模のボーンバンクネットワークを構築することが急務である。本研究の目的は、そのモデルケースとして、熊本県下でドナーが発生した場合に熊本大学医学部整形外科に編成した採取チームが骨採取に出動し、採取した骨を東海骨バンクで処理、保存する体制を構築することである。

B 方法

- ①熊本大学医学部整形外科の中に推進委員会を立ち上げ、同種骨採取チームを編成する。
- ②同種骨採取チームに対して非生体ドナーからの骨採取に必要な教育プログラムを実施する。
- ③骨採取のための器材を準備する。
- ④骨採取の準備状況、採取骨の搬送体制、連絡体制などについて東海骨バンクと協議を行う。
- ⑤ドナー発生時の対応、連絡体制などについて熊本地区の移植コーディネーターと協議を行う。
- ⑥ドナー発生時の同種骨採取チーム及び東海骨バンクの活動についてシミュレーションを行う。

C 結果

- ①推進委員会を立ち上げ、本年度の取り組みについて協議した(4月)。同種骨採取チームについては、ドナー発生時に24時間いつでも派遣が可能となるように熊本大学医学部整形外科に所属する医師により2チーム(各々医師3名と4名で構成)を編成した(5月)。
- ②日本整形外科学会移植・再生医療委員会で作成された「整形外科移植に関するガイドライン」、「冷凍ボーンバンクマニュアル」、及びDVD「骨採取の実際」に基づいて同種骨採取チームに対する教育プログラムを実施した(6月、9月に各2回実施)。
- ③骨採取器材チェックリストに従い器材を準備し、新規購入が必要なものについてはリストを作成し見積もりを取った(9月)。
- ④同種骨採取チームの準備状況と今後の課題について、9月24日に東海骨バンクの蜂谷裕道代表幹事と第1回目の協議を行った。
- ⑤11月24日に熊本赤十字病院の西村真理子移植コーディネーターに非生体ドナー発生時の同種骨採取について協力を依頼し、その際の対応や連絡体制などについて協議を行った。
- ⑥ドナー発生時の同種骨採取チームの対応についてシミュレーションを行った(9月)。本年度中に拠点バンクである東海骨バンクとの共同シミュレーションを行う予定である。

D 考察 E 結論

ドナー発生時にいつでも骨採取が可能であるためには3~4人の医師から構成される骨採取チームが複数必要である。また採取した骨組織を拠点バンクに搬送するまでの保管にはチームの所属施設に -80° の冷凍庫が必要である。これらの点から骨採取チームを編成できる施設は限定され、地域の大学病院整形外科がその主体となると考えられる。骨採取チームに対する教育プログラムとしては上記の日本整形外科学会移植・再生医療委員会で作成された資料を用いることで基本的事項については可能と考えられるが、チームの標準化を図るためにはチーム代表者への研修会や骨採取の実技指導の実施なども考慮される必要がある。残された課題としては、ドナー発生時の骨採取チームへの連絡体制及び骨採取に関するインフォームドコンセントの取得方法、拠点バンクと骨採取チームが所属する施設との情報伝達体制、拠点バンクへの搬送体制の確立があり、今後移植コーディネーター及び拠点バンクと具体的に協議を詰めていく必要がある。

バーコードによる同種骨管理システムの有効性の検討

研究分担者 長谷川幸治

名古屋大学大学院医学系研究科機能構築医学専攻運動・形態外科学整形外科学 准教授

研究協力者 松岡篤史 加納稔也 関大輔

名古屋大学大学院医学系研究科機能構築医学専攻運動・形態外科学整形外科学 医員

A 研究目的

骨バンクネットワーク東海では、骨バンク管理システムにおける5つの問題点、①個人情報守秘化、②提供体制、③供給体制、④管理体制、⑤トレーサビリティ、を解決するため2010年1月からバーコード管理システムを導入した。本研究の目的は、バーコードによる同種骨管理システムの有効性と問題点を検討することである。

B 方法

- ①骨頭採取：大腿骨頭採取は、まず同意書を作成し、専用ラベルに患者情報を記入した。大腿骨頭は手術室で摘出した直後にジップロックで4重包装とした。摘出時、骨組織の一部を細菌培養検査に提出した。
- ②バーコード作成：2010年1月からは骨頭情報をコード化し、バーコードラベルを作成して管理した。バーコードは15ケタの骨バンク専用コードとしcode128を使用した。内容は個数番号、摘出日、施設、管理者、原疾患、軟骨除去、重量と定義し、データベースに骨頭情報を入力することでバーコードデータ化した。また保管用コンテナ番号、原疾患、摘出日の必須情報は、バーコードの下方に明示した。
- ③バーコード登録：骨頭はラベルの記入を確認して登録した。データベース上への登録によって固有ID番号が作成され、バーコードラベルが発行された。ラベルを袋に貼り専用冷凍庫に収納した。
- ④バーコード供給：移植施設から骨頭供給の依頼を受け、データベース上で適切な骨頭を選択した。患者情報ラベルをもとに目指す骨頭を取り出し、バーコードラベルをスキャンして供給登録し、患者情報ラベルは除去した。供給証明書、受領確認書、使用報告書を発行し、受領確認書には受け取り者の署名を義務付けた。
- ⑤同種骨使用：供給された骨頭は、移植した日時、病院、患者ID、手術内容を使用報告書に記入し、使った骨頭のバーコードラベルを貼って骨バンクへFAXするように依頼した。

C 結果

2010年1月から2011年9月までの間に、8施設から342個の骨頭が骨バンクに提供されバーコード登録管理とした。11施設へ270個の骨頭を供給した。細菌培養陽性1個、HTLV-I陽性2個、情報未記入項目あり4個、摘出時の操作違反2個の9個の骨頭が廃棄された。合併症の報告はなかった。1施設で、カルテへのバーコード取り込み不能の報告があった。

D 考察 E 結論

2010年1月から2011年9月までにバーコード同種骨管理システムで管理した大腿骨頭は、提供342個、供給270個、廃棄9個であった。バーコード管理システム上に判明した問題点は、①簡易マニュアル作成、②専用プリンタによる画質向上、③スキャナ端末の変更、④術後3ヶ月での定時報告体制の対応で解決した。残された課題の解決が、今後の骨バンク活動の発展に必要なものである。

同種骨移植の細菌学的問題及び医療保険上の取り扱い、 全国規模の骨バンクネットワーク構築に関するアンケート調査

研究分担者 神宮司誠也 九州労災病院整形外科・副院長

研究協力者 内田健太郎 北里大学医学部整形外科学・助教

占部 憲 津久井赤十字病院整形外科・ひざ関節センター部長

A 研究目的

近年、同種骨移植の需要が年々増加している。従って、同種骨の安全性の担保と供給源の確保は極めて重要である。現在、国内では骨バンクネットワークが整備されていないため、200以上の病院において自施設で採取した大腿骨頭（生体ドナー）を保存して移植に利用する施設内骨バンクを運営しているが、必ずしも安全性が確保されているとは言い難い。また、組織移植学会が認定する骨バンクは2施設しかなく、ドナーへの対応可能な範囲が限られているため、全国的な同種組織の需要に対応できない。本研究では、より安全で良質の同種骨を供給するための社会基盤整備を目指して、1. 同種骨移植の細菌学的問題及び医療保険上の取り扱い、2. 全国規模の骨バンクネットワーク構築に関するアンケート調査を行った。

B 方法

- ①同種骨移植の細菌学的問題及び医療保険上の取り扱いに関するアンケート調査：日整会認定研修施設を対象に、同種骨移植の細菌検査の有無とタイミング、移植後の感染発生の有無、切除大腿骨頭移植の診療報酬請求の有無について調査した。
- ②全国の大学に対して、「全国規模のボーンバンクネットワーク構築」についてアンケート調査を行い、問題点を検討した。

C 結果

- ①同種骨移植の細菌学的検査および医療保険上の取り扱い：採取組織の細菌学的検査を行っている施設は61%に過ぎず、またその検査時期は一定していなかった。同種組織移植後に細菌感染を経験した施設は10.9%、同種骨移植後に感染症の追跡調査をしている施設は41%に留まった。これらの施設内骨バンクは、日本組織移植学会の「ヒト組織を利用する医療行為の安全性確保・保存・使用に関するガイドライン」に準拠していないにもかかわらず、76.6%の施設で切除大腿骨頭を用いた同種骨移植術を診療報酬請求していた。
- ②ボーンバンクネットワークの構築について：全国大学整形外科学教室に対するアンケート調査の結果、ボーンバンクネットワークの構築について89%の施設が関心はあるが、骨採取チームを編成できる施設は11施設に留まった。しかし、自施設でドナーが発生した場合には採取可能とする施設は71%であり、62%の施設では拠点バンクに搬送するまで一時保存する-80℃の冷凍庫を保有していた。

D 考察 E 結論

本研究で行った日整会認定研修施設に対するアンケート調査の結果、自施設で用いるために生体ドナーから採取した同種骨を保存している施設では、必ずしも安全性が確保されていないことが明らかになった。このような結果は、小さな大腿骨頭に対する採取組織の細菌学的検査を含めた、感染症検査を徹底する手順の煩雑さ、その際に要する費用の負担などにも問題があるものと思われた。しかし、平成22年度版、医科点数表の解釈・K059(5)同種骨（凍結保存された死体骨を含む）を移植する場合においては、「日本組織移植学会が作成した「ヒト組織を利用する医療行為の安全性確保・保存・使用に関するガイドライン」に準拠していないにもかかわらず、76.6%の施設で切除大腿骨頭を用いた同種骨移植術を診療報酬請求していた。従って、拠点バンクによる中央管理システムの構築による同種骨の安全性の担保が急務であると考えられた。

全国の大学の整形外科学教室に行ったアンケート調査では、24時間対応可能な骨採取チームを編成できる施設は11施設のみであったが、自施設であれば採取可能という施設が42施設（71%）あったことから、全国的なネットワークを形成し、現存する日本組織移植学会認定バンク2施設を拠点バンクとしてかなりの範囲で非生体ドナーからの組織採取が行われる可能性があることが明らかになった。今後これらの施設との連携を強化し、ボーンバンクネットワークを確立することで、全国の需要に対応し得る供給体制を整備することが可能であると考えられた。

抑制性 T 細胞類似の細胞による
免疫寛容誘導の試み

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業研究事業）

「抑制性 T 細胞類似の細胞による免疫寛容誘導の試み」研究発表報告

研究代表者 寺岡 慧 国際医療福祉大学熱海病院 病院長・移植外科教授

研究分担者 奥村 康 順天堂大学アトピーセンター長

垣生園子 順天堂大学免疫学教授

清野研一郎 北海道大学遺伝子病制御研究所病態研究部門免疫生物分野教授

研究協力者 小山一郎 東京女子医科大学腎臓外科助教

我々は自己リンパ球由来の調節性 T 細胞様の細胞を生体外で誘導し、この細胞を腎移植後のアカゲサルに移入することにより、移植医療における究極の目標である免疫寛容を導入することに成功した。具体的にはアカゲサルの実験的腎移植モデルにおいて、レシピエントの T リンパ球とドナーの抗原提示細胞を、抗 CD80/ CD86 抗体の存在下に 14 日間混合培養して強い免疫抑制活性を有する CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺調節性 T 細胞様細胞を誘導し、この細胞を腎移植後レシピエントサルに移入することにより、ドナー特異的免疫寛容を誘導することに成功した (J Clin Invest, 2005)。サルを用いた臓器移植において免疫寛容状態を誘導する手法は、我々の提唱したもの以外には世界でもきわめて限られている。その後ヒトリンパ球においても CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺Foxp3⁺リンパ球 (TReg) を誘導することに成功し、このリンパ球がドナー特異的、かつ容量依存性にリンパ球混合培養 (MLR) を抑制することが明らかとなった (平成 21 年度度総括研究報告書)。

我々の研究は、このレシピエント自己リンパ球から誘導されたドナー抗原特異的調節性 T 細胞 (donor-specific regulatory T cell, DS-TReg) を腎移植レシピエントに投与することによりドナー特異的免疫寛容の導入を試みるものである。ドナー特異的免疫寛容が誘導されたか否かの確認は、ドナー抗原に対する MLR が第三者に対する MLR (D/3rdP MLR) に比して十分に低いことを確認した上で免疫抑制薬を減量し、最終的に免疫抑制薬を中止することによって確認する。この過程において、血清クレアチニン値 超音波ドップラー検査、リンパ球サブセット、MLR、必要に応じて移植腎生検による組織所見などを検討し、総合的に判断しつつ慎重に進めることにより患者の安全性を確保する。

平成 23 年 3 月末の時点で、総計 13 例にこの方法を用いて腎移植を実施し、D/3rdP MLR ではドナー特異的低応答性が認められた。腎移植は東京女子医科大学腎臓外科において行い、症例 1~10 例目までは移植時に脾摘を追加したが、11~13 例目においては脾摘を行わず移植前に rituximab 200mg を静脈内投与した。ドナーおよびレシピエントリンパ球の採取は東京女子医科大学輸血部 Cell Processing Center において行った。ドナーおよびレシピエントリンパ球の共培養は東京女子医科大学 Cell Processing Unit で行った。腎移植後 12~33 日目に培養で得られたドナー抗原特異的調節性 T 細胞 (donor-specific regulatory T cell, DS-TReg) を 0.075~1.5x10⁹ 個を静脈内投与した。培養細胞の輸注に際しては、エンドトキシン定性試験で陰性であることを確認の上輸注した。また培養細胞輸注の約 1 週間

前から cyclophosphamide 25~30mg/kg/日を2~3回静脈内に投与した。DS-TRegによるドナー特異的低応答性の誘導の確認については、移植後経時的にドナーおよび3rd partyのリンパ球とレシピエントリンパ球との混合培養(MLR)を行い、それぞれの stimulation index (SI) の比(D/3rd party SI比)により確認した。13例中1例は腎移植後2ヵ月で肺梗塞を併発したため、本臨床試験から除外した。他の12例においてはD/3rd party SI比の低下を確認しつつ免疫抑制薬を漸減した。

移植後1年目におけるCsA、MMFの平均投与量を、conventional群のそれぞれ49.6%、45.6%にまで減量しえた。その後免疫抑制剤をさらに減量し、2例において少量CsAのみ(10mg/日単独、25mg/日単独)、6例において低容量CsAおよびMMFのみ(20mg/125mg、25mg/250mg、35mg/250mg、35mg/500mg、75mg/500mg、100mg/500mg いずれも1日投与量)まで減量を行った。しかし免疫抑制剤の減量の過程で12例中7例に拒絶反応が発生した。全例とも治療により拒絶反応は寛解した。移植腎生検を行い、病理組織学的検討、免疫組織学的検討を行った。

上記の検討の結果、今後完全な免疫抑制薬の中止を目指すには、同種移植抗原移入時において免疫記憶を抑制しうる何らかのプロトコールの変更が必要と考えられた。平成23年度においては、導入時に抗ヒト胸腺細胞ウサギ抗体およびrituximabを追加する新たなプロトコールのもとで本プロジェクトを遂行する予定である。

移植医療の社会的基盤に関する研究