

II. 分担研究報告

「抗CD80抗体および抗CD86抗体を用いた制御性T細胞の誘導」

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

研究分担者：場集田 寿

順天堂大学医学部 免疫学講座・助教

研究分担者：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

研究要旨：我々は抗CD80抗体および抗CD86抗体をリンパ球培養液に添加することで *ex vivo* において抗原特異的Treg様細胞の誘導に成功し、本細胞を輸注することでサル腎移植モデルにおいて免疫抑制フリーの状態でも移植腎が長期生着し、ドナー抗原特異的免疫寛容が誘導されることを報告してきた。本研究では、生体肝移植患者を対象とし、抗CD80抗体および抗CD86抗体を用いた制御性T細胞の誘導法を確立することを目的とし、種々の検討を行った。肝移植症例計8例において、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を抗CD80抗体および抗CD86抗体存在下に2週間共培養することで、制御性T細胞の誘導を試み、その抗原特異的免疫抑制能を検討した。本培養法により8例中7例においてCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺やCD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺制御性T細胞が高率に誘導された。また、制御性T細胞は *in vitro* において比較的抗原特異的にMLRを抑制した。培養細胞輸注による明らかな副作用は認められず、本制御性T細胞を用いる細胞治療の安全性も確認された。

A. 目的

抗CD80抗体および抗CD86抗体を用いた制御性T細胞の誘導法を確立するにあたり、昨年度は1) 細胞の培養方法と至適培養条件、2) 誘導される制御性T細胞誘導効率と細胞種の変化、3) 培養細胞後の回収した細胞の安全性を確認した。今年度は、実際の生体肝移植患者およびそのドナーからなる計8例の肝移植症例を対象とし、抗CD80抗体および抗CD86抗体を用いた制御性T細胞誘導法につき、以下の検討を行った。

1) 制御性T細胞誘導効率

2) 培養細胞の細胞分画（細胞種）の変化

3) 培養細胞のMLR抑制能

B. 方法

1) 細胞培養

培養液は ALyS505N-0 B10 (IL-2 不含) 1000 mL カルチャーバック入り（細胞科学研究所）を使用した。血清はレシピエント細胞で回収された血清を非動化して使用した。比重分離液は Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare) を使用した。抗CD80抗体(2D10.4)および抗CD86抗体(IT2.2)はそれぞれ 10 µg/ml で使用した。ヒト末梢血細胞は

アフエレーシスを行い回収した細胞を使用した。また、ドナー細胞は 30Gy で放射線照射した細胞を凍結保存し、培養時に解凍して使用した。

培養手順は以下の通りに行った。

- ① ドナーにアフエレーシスを行い、回収した細胞に 30Gy で放射線照射を行い、2 分割し凍結保存した。
- ② レシピエントにアフエレーシスを行い、細胞を回収。回収する際、レシピエントの血清を非動化した。
- ③ 培養液に非動化したレシピエントの血清を 1%(v/v)になるように加え、レシピエント細胞、解凍したドナー細胞、抗 CD80 抗体および抗 CD86 抗体を加え 1 週間共培養した。
- ④ 1 週間後に、培養細胞を回収し細胞を洗浄。
- ⑤ 培養細胞、ドナー細胞、抗 CD80 抗体、抗 CD86 抗体および 1%(v/v)血清を培養液に加えて更に 1 週間共培養した。
- ⑥ 2 週間培養した細胞を用いてそれぞれの解析を行った。

2) 制御性 T 細胞誘導効率の検討

培養前および抗 CD80 抗体および抗 CD86 抗体存在下に誘導した培養リンパ球中の制御性 T 細胞誘導効率は、以下の制御性 T 細胞マーカーを染色し、BD FACS Calibur を用いて検討を行った。抗体は BD Bioscience の PE-CyTM5 Mouse Anti-Human CD4 (RPA-T4), FITC Mouse Anti-Human CD25 (M-A251), FITC Mouse Anti-Human CD127 (HIL-7R-M21), PE Mouse Anti-Human FoxP3 (259D/C7)および PE Mouse Anti-Human CD152(BNI3)を用いて染色し Flow Jo にて解析を行った。

3) 培養細胞の分画についての検討

培養後の細胞について表面抗原を解析し、培養細胞に含まれる細胞分画について検討した。抗体は BD Bioscience

の FITC Mouse Anti-Human CD3, PE-CyTM5 Mouse Anti-Human CD4 (RPA-T4), PE-CyTM5 Mouse Anti-Human CD8 (RPA-T4), FITC Mouse Anti-Human CD14 (M5E2), PE Mouse Anti-Human CD19 (HIB19), TriTEST CD3 FITC/CD16+CD56 PE/ CD45 PerCP, Lineage Cocktail 1(Lin 1), PE Mouse Anti-Human CD11c (B-ly6), PE Mouse Anti-Human CD123 (9F5), PE Mouse Anti-Human HLA-DR (L234)を用いて染色し Flow Jo にて解析を行った。

4) 培養細胞の MLR 抑制能についての検討

Stimulator (ドナー および 3rd パーティー)は 30 Gy で放射線照射をした細胞を使用した。Responder (レシピエント)および Stimulator の細胞濃度は 1×10^5 /well で共培養し、リンパ球混合培養 (MLC) を行った。この培養系に抗 CD80 抗体および抗 CD86 抗体存在下に誘導した培養リンパ球を加え、1 週間共培養した。培養終了 16 時間前にチミジンを $1 \mu\text{Ci}/\text{well}$ 加えてβ線シンチレーションカウンターでチミジンと取り込みを評価し、MLR 抑制能を検討した。

C. 結果

臨床試験症例#1

総リンパ球数は培養前の 3.43×10^9 から 2 週間培養後に 0.61×10^9 となった。表面抗原の解析により、これらのリンパ球の表現型解析を行うと、CD3⁺CD4⁺細胞は 2 週間培養により、30.0%から 42.2%と約 12%の上昇を認めた。一方、制御性 T 細胞である CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞は、0.8%から 5.1%と上昇した。更に CD4⁺細胞中の比率を見ると、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞は 4.5%から 12.2%、CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺細胞は 3.5%から 25.0%、CD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺細胞は 0.2%から 16.0%へとそれぞれ上昇し

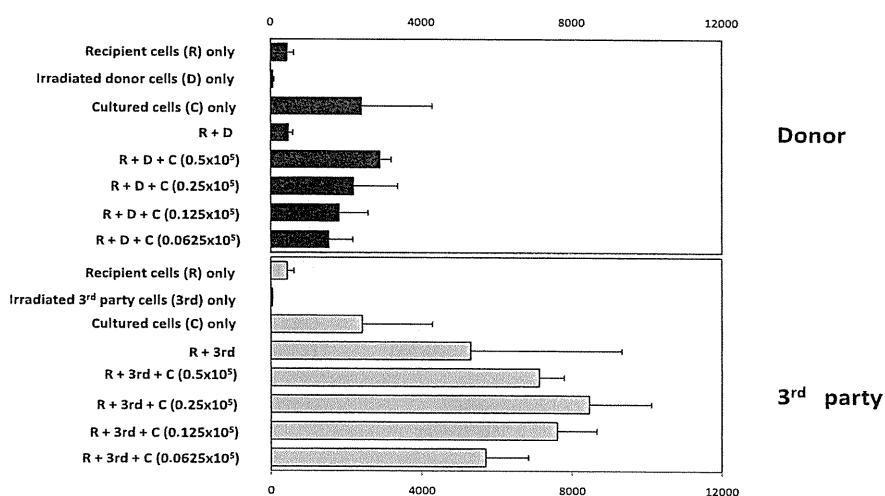
表1. 臨床試験1例目の培養細胞のデータ(細胞数・Treg phenotype)

	培養開始時	1週間培養後	2週間培養後
リンパ球数 (x10 ⁹) (生細胞率:%)	3.43 (99)	2.09 (90.95)	0.605 (89.5)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	30.00	-	42.20
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (%)	0.78	-	5.11
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	4.54	-	12.20
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	3.50	-	25.00
CD4 ⁺ CD127 ^{low} Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	0.21	-	16.00

表2. 臨床試験1例目の培養細胞のデータ(細胞phenotypeのTable)

Phenotype	細胞種	培養前 (%)	2週間培養後 (%)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD4 ⁺ T cell	30	42.2
CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ T cell	27.5	43.5
CD3 ⁻ CD19 ⁺	B cell	2.63	1.46
CD3 ⁻ CD16 ⁺ 56 ⁺ CD45 ⁺	NK cell	6.17	5.39
CD14 ⁺ SCC ^{mid}	Monocyte	8.1	6.5
Lin1 ⁻ CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	Myeloid DC	0.005	0.0008
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	Plasmacytoid DC	0.306	0.0002
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁻	Granulocyte	0.009	0.01

図1. 臨床試験1例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



た(表1)。表面抗原を解析の結果、CD4⁺T細胞が42.2%、CD8⁺T細胞が43.5%とT細胞が85%以上を占めた。これに対し、B細胞、NK細胞はそれぞれ1.5%、5.4%であった。また、単

球は6.5%であった。さらに、樹状細胞が0.001%、顆粒球が0.01%程度認められた(表2)。

誘導された制御性T細胞を含む細胞が免疫抑制効果を示すか、MLRを用い

て検討した(図1)。 1×10^5 /well のレシピエント細胞、照射したドナー細胞に、培養細胞 (0.0625×10^5 /well, 0.125×10^5 /well, 0.25×10^5 /well, 0.50×10^5 /well)を加え共培養を行いチミジンの取り込みで評価した。MLRの結果(mean \pm SD)は、培養細胞を加えない(control)群(481 ± 107)、培養細胞を 0.0625×10^5 /well 加えた群(1549 ± 628)、培養細胞を 0.125×10^5 /well 加えた群(1830 ± 754)、培養細胞を 0.25×10^5 /well 加えた群(2207 ± 1163)、培養細胞を 0.50×10^5 /well 加えた群(2910 ± 288)であった。この結果は小規模試験とは逆の結果であったが、Control 群の反応がないことから培養細胞のみが増殖した結果と判断された。以降、2 例目よりレシピエント細胞を培養時に凍結して MLR 時に解凍して使用することとした。

臨床試験症例#2

総リンパ球数は培養前の 6.9×10^9 から 2 週間培養後に 2.54×10^9 となった。表面抗原の解析により、これらのリンパ球の表現型解析を行うと、 $CD3^+CD4^+$ 細胞は 2 週間培養により、48.0%から 65.3%と約 17%の上昇を認めた。一方、制御性 T 細胞である

$CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 細胞は、1.2%から 19.5%と上昇した。更に $CD4^+$ 細胞中の比率を見ると、 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 細胞は 3.2%から 28.1%、 $CD4^+CD25^+CTLA4^+$ 細胞は 4.0%から 21.7%、 $CD4^+CD127^{low}Foxp3^+$ 細胞は 0.4%から 23.4%へとそれぞれ上昇した(表3)。表面抗原を解析の結果、 $CD4^+$ T 細胞が 65.3%、 $CD8^+$ T 細胞が 24.6%と T 細胞が 89%以上を占めた。これに対し、B 細胞、NK 細胞はそれぞれ 7.9%、2.0%であった。また、単球は 6.3%であった。さらに、樹状細胞が 0.6%、顆粒球が 0.2%程度認められた(表4)。

誘導された制御性 T 細胞を含む細胞が免疫抑制効果を示すか、MLR 法を用いて検討した(図2)。 1×10^5 /well のレシピエント細胞、照射したドナー細胞に、培養細胞(0.03125×10^5 /well, 0.0625×10^5 /well, 0.125×10^5 /well, 0.25×10^5 /well, 0.50×10^5 /well, 1.0×10^5 /well)を加え共培養を行いチミジンの取り込みで評価した。MLRの結果(mean \pm SD)は、培養細胞を加えない(control)群(26735 ± 5216)、培養細胞を 0.03125×10^5 /well 加えた群(34924 ± 3526)、培養細胞を 0.0625×10^5 /well 加えた群($23441 \pm$

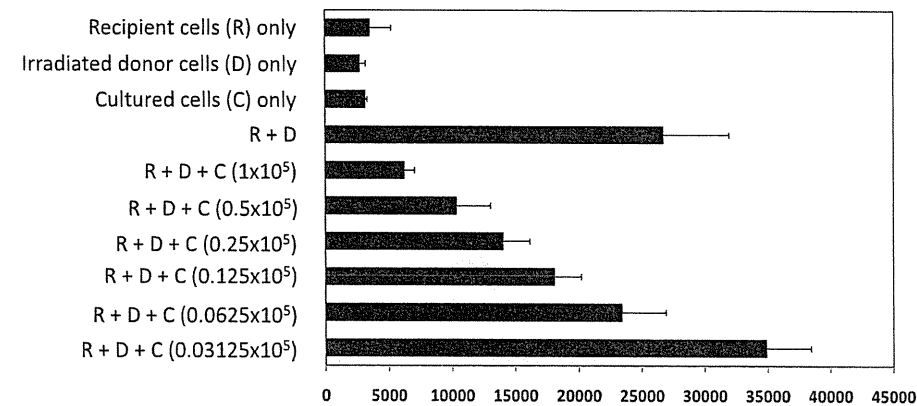
表3. 臨床試験2例目の培養細胞のデータ(細胞数・Treg phenotype)

	培養開始時	1週間培養後	2週間培養後
リンパ球数 ($\times 10^9$) (生細胞率:%)	4.19 + 2.69 (100) (99.6)	3.81 (95.6)	2.54 (93.2)
Donorリンパ球数 ($\times 10^9$) (生細胞率 %)	3.27 (94.9)	3.27	-
$CD3^+CD4^+$ (%)	48.00	-	65.30
$CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (%)	1.17	-	19.46
$CD4^+CD25^+Foxp3^+/CD4^+$ (%)	3.21	-	28.10
$CD4^+CD25^+CTLA4^+/CD4^+$ (%)	4.02	-	21.70
$CD4^+CD127^{low}Foxp3^+/CD4^+$ (%)	0.41	-	23.40

表4. 臨床試験2例目の培養細胞のデータ(細胞phenotypeのTable)

Phenotype	細胞種	培養前 (%)	2週間培養後 (%)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD4 ⁺ T cell	48	65.30
CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ T cell	212.4	24.60
CD3 ⁻ CD19 ⁺	B cell	2.66	7.90
CD3 ⁻ CD16 ⁺ 56 ⁺ CD45 ⁺	NK cell	4.57	1.98
CD14 ⁺ SCC ^{mid}	Monocyte	19.4	6.28
Lin1 ⁻ CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	Myeloid DC	0.32	0.50
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	Plasmacytoid DC	0.37	0.12
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁻	Granulocyte	0.32	0.20

図2. 臨床試験2例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



3469)、培養細胞を 0.125x10⁵/well 加えた群(18124 ± 2080)、培養細胞を 0.25x10⁵/well 加えた群(14070 ± 2102)、培養細胞を 0.50x10⁵/well 加えた群(10364 ± 2690)、培養細胞を 1.0x10⁵/well 加えた群(6275 ± 785)であった。

臨床試験症例#3

総リンパ球数は培養前の 9.4 × 10⁹ から 2 週間培養後に 0.8 × 10⁹ となった。表面抗原の解析により、これらのリンパ球の表現型解析を行うと、CD3⁺CD4⁺細胞は 2 週間培養により、30.6%から 66.6%と約 36%の上昇を認めた。一方、制御性 T 細胞である CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞は、1.1%から 10.1%と上昇した。更に CD4⁺細胞中

の比率を見ると、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞は 2.35 % から 18.0 %、CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺細胞は 1.96 % から 33.1%、CD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺細胞は 2.5%から 13.2%へとそれぞれ上昇した(表 5)。表面抗原を解析の結果、CD4⁺ T 細胞が 66.6%、CD8⁺ T 細胞が 16.4%と T 細胞が 83%以上を占めた。これに対し、B 細胞、NK 細胞はそれぞれ 4.8%、5.9%であった。また、単球は 18.2%であった。さらに、樹状細胞が 0.9%、顆粒球が 0.01%程度認められた(表 6)。

誘導された制御性 T 細胞を含む細胞が免疫抑制効果を示すか、MLR 法を用いて検討した(図 3)。1x10⁵/well のレシピエント細胞、照射したドナー細胞に、培養細胞(0.03125x10⁵/well,

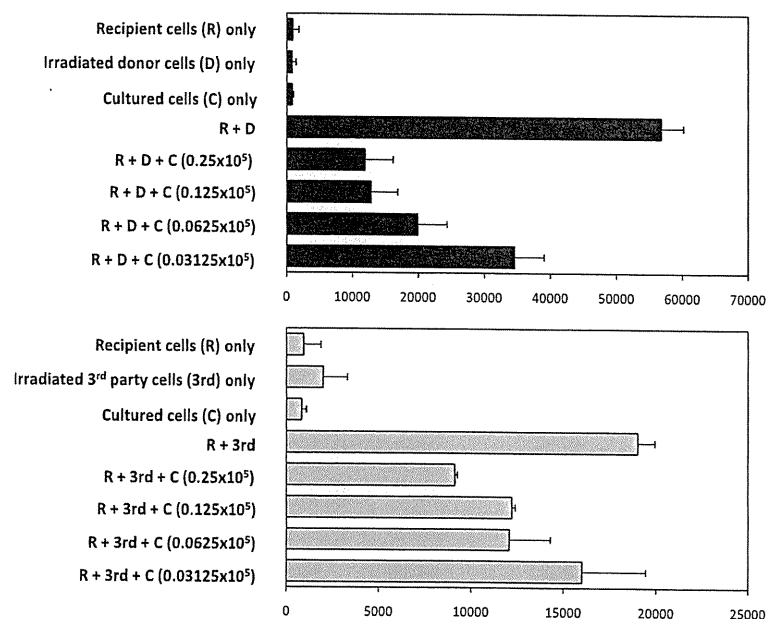
表5. 臨床試験3例目の培養細胞のデータ(細胞数・Treg phenotype)

	培養開始時	1週間培養後	2週間培養後
リンパ球数 (x10 ⁹) (生細胞率:%)	5.05 + 4.38 (99.6) (99.5)	4.002 (77.4)	0.785 (77.2)
Donorリンパ球数 (x10 ⁹) (生細胞率 %)	3.625 (99.7)	3.625	-
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	30.6	-	66.6
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (%)	1.12	-	10.05
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	2.35	-	18
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	1.96	-	33.1
CD4 ⁺ CD127 ^{low} Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	2.46	-	13.2

表6. 臨床試験3例目の培養細胞のデータ(細胞phenotypeのTable)

Phenotype	細胞種	培養前 (%)	2週間培養後 (%)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD4 ⁺ T cell	30.6	66.6
CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ T cell	14.9	16.4
CD3 ⁻ CD19 ⁺	B cell	7.41	4.8
CD3 ⁻ CD16 ⁺ 56 ⁺ CD45 ⁺	NK cell	3.92	5.87
CD14 ⁺ SCC ^{mid}	Monocyte	27.4	18.2
Lin1 ⁻ CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	Myeloid DC	0.76	0.068
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	Plasmacytoid DC	0.29	0.017
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁻	Granulocyte	0.79	0.013

図3. 臨床試験3例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



0.25x10⁵/well)を加え共培養を行いチミジンの取り込みで評価した。MLRの結果(mean±SD)は、培養細胞を加えない(control)群(56821±3355)、培養細胞を0.03125x10⁵/well加えた群(34581±4484)、培養細胞を0.0625x10⁵/well加えた群(19904±4462)、培養細胞を0.125x10⁵/well加えた群(12781±4069)、培養細胞を0.25x10⁵/well加えた群(11895±4265)であった。更に、ドナー細胞を3rd partyに変更して同様のMLRを行った。3rd partyのMLRの結果は、培養細胞を加えない(control)群(19024±915)、培養細胞を0.03125x10⁵/well加えた群(16008±3434)、培養細胞を0.0625x10⁵/well加えた群(12088±2214)、培養細胞を0.125x10⁵/well加えた群(12222±175)、培養細胞を0.25x10⁵/well加えた群(9142±129)であった。

臨床試験症例#4

総リンパ球数は培養前の末梢血単核球 4.541×10⁹、脾細胞 1.254×10⁹ から2週間培養後に 2.45×10⁹ となった。

表面抗原の解析により、これらのリンパ球の表現型解析を行うと、CD3⁺CD4⁺細胞は2週間培養により、末梢血単核球 26.8%、脾細胞 11.2%か

ら 64.5%へと上昇を認めた。一方、制御性T細胞である CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞は、末梢血単核球 3.21%、脾細胞 1.51%から 14.9%へと上昇した。更に CD4⁺細胞中の比率を見ると、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞は末梢血単核球 7.45%、脾細胞 5.67%から 27.9%、CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺細胞は末梢血単核球 3.63%、脾細胞 6.53%から 27.7%、CD4⁺CD127^{low}Foxp3⁺細胞は末梢血単核球 13.9%、脾細胞 12.4%から 26.5%へとそれぞれ上昇した(表7)。表面抗原を解析の結果、CD4⁺T細胞が64.5%、CD8⁺T細胞が17.6%とT細胞が82%以上を占めた。これに対し、B細胞、NK細胞はそれぞれ4.43%、5.75%であった。また、単球は1.92%であった。さらに、樹状細胞が1.38%、顆粒球が0.73%程度認められた(表8)。

誘導された制御性T細胞を含む細胞が免疫抑制効果を示すか、MLR法を用いて検討した(図4)。1x10⁵/wellのレシピエント細胞、照射したドナー細胞に、培養細胞(0.03125x10⁵/well, 0.0625x10⁵/well, 0.125x10⁵/well, 0.25x10⁵/well)を加え共培養を行いチミジンの取り込みで評価した。MLRの結果(mean±SD)は、培養細胞を加えない(control)群(13172±4728)、培養細胞を

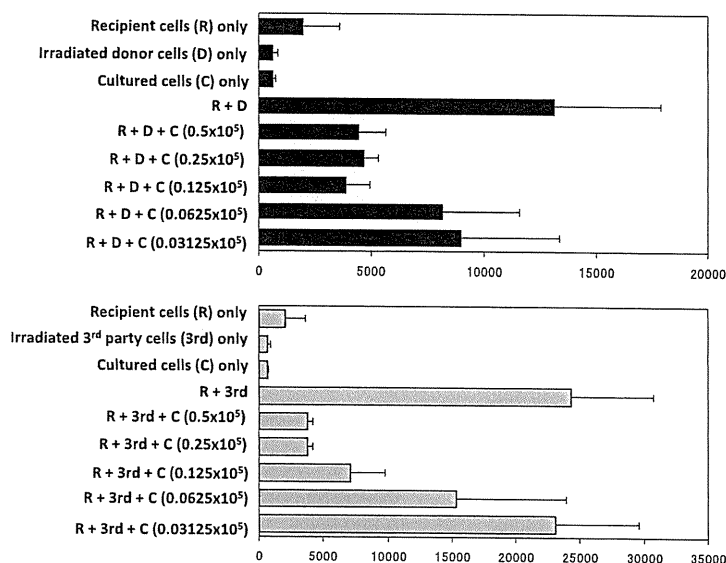
表7. 臨床試験4例目の培養細胞のデータ(細胞数・Treg phenotype)

	培養開始時	1週間培養後	2週間培養後
リンパ球数(x10 ⁹) (生細胞率:%)	4.541 + 1.254 (98.1)	3.62 (95.8)	2.45 (71.8)
Donorリンパ球数(x10 ⁹)	約3.0	約3.0	-
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	26.8 + 11.2	-	64.5
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (%)	3.21 + 1.51	-	14.9
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	7.45 + 5.67	-	27.9
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	3.63 + 6.53	-	27.7
CD4 ⁺ CD127 ^{low} Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	13.9 + 12.4	-	26.5

表8. 臨床試験4例目の培養細胞のデータ(細胞phenotypeのTable)

Phenotype	細胞種	培養前 (%)	2週間培養後 (%)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD4 ⁺ T cell	26.8 (11.2)	64.5
CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ T cell	8.59 (5.0)	17.6
CD3 ⁻ CD19 ⁺	B cell	12.9 (17.0)	4.43
CD3 ⁻ CD16 ⁺ 56 ⁺ CD45 ⁺	NK cell	13.3 (8.1)	5.75
CD14 ⁺ SCC ^{mid}	Monocyte	10.2 (2.1)	1.92
Lin1 ⁻ CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	Myeloid DC	0.81 (1.76)	1.11
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	Plasmacytoid DC	0.39 (0.12)	0.27
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁻	Granulocyte	1.33 (0.12)	0.73

図4. 臨床試験4例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



0.03125x10⁵/well 加えた群(9025±4372)、培養細胞を 0.0625x10⁵/well 加えた群(8207±3400)、培養細胞を 0.125x10⁵/well 加えた群(3894±1068)、培養細胞を 0.25x10⁵/well 加えた群(4488±1139)であった。更に、ドナー細胞を 3rd party に変更して同様の MLR を行った。3rd party の MLR の結果は、培養細胞を加えない (control) 群(24315±6426)、培養細胞を 0.03125x10⁵/well 加えた群(23116±6495)、培養細胞を 0.0625x10⁵/well 加えた群(15324±8565)、培養細胞を 0.125x10⁵/well 加えた群(7128±2665)、培養細胞を 0.25x10⁵/well 加えた群(3739±420)であった。

臨床試験症例#5

総リンパ球数は培養前の末梢血単核球 4.35x10⁹、脾細胞 0.56x10⁹から 2 週間培養後に 0.63x10⁹となった。

表面抗原の解析により、これらのリンパ球の表現型解析を行うと、CD3⁺CD4⁺細胞は 2 週間培養により、末梢血単核球 19.0%、脾細胞 15.3%から 78%へと上昇を認めた。一方、制御性 T 細胞である CD4⁺ CD25⁺Foxp3⁺細胞は、末梢血単核球 1.02%、脾細胞 1.07%から 2.22%へと上昇した。更に CD4⁺細胞中の比率を見ると、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞は末梢血単核球 6.51%、脾細胞 5.84%から 3.40%、

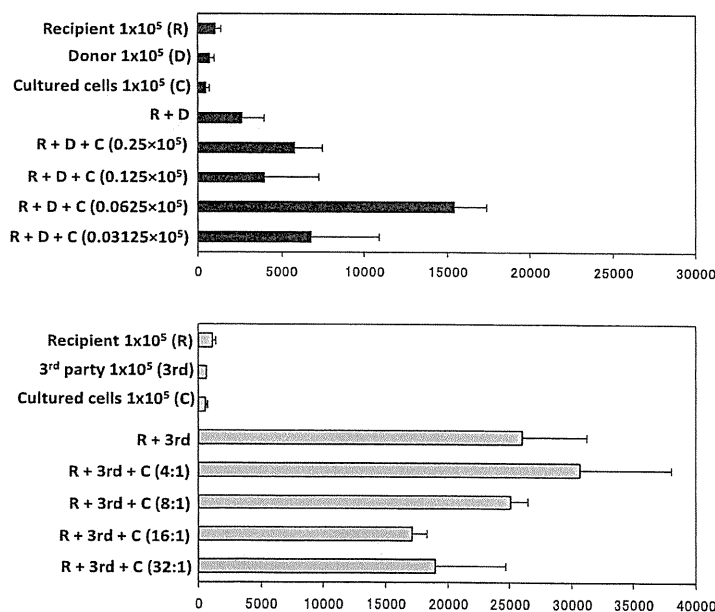
表9. 臨床試験5例目の培養細胞のデータ(細胞数・Treg phenotype)

	培養開始時	1週間培養後	2週間培養後
リンパ球数 ($\times 10^9$) (生細胞率%)	PBMCs Splenocytes 4.35, 0.56 (100) (94)	1.83 (80.4)	0.63 (78)
Donorリンパ球数 ($\times 10^9$)	3.0	3.0	-
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	19.0, 15.3	-	78
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (%)	1.02, 1.07	-	2.22
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	6.51, 5.84	-	3.40
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	4.64, 5.21	-	3.34
CD4 ⁺ CD127 ^{low} Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	1.25, 1.13	-	3.62

表10. 臨床試験5例目の培養細胞のデータ(細胞phenotypeのTable)

Phenotype	細胞種	培養前 (%)		2週間培養後 (%)
		PBMCs	Splenocytes	
CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD4 ⁺ T cell	19.0,	15.3	78.4
CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ T cell	1.60,	5.3	5.93
CD3 ⁻ CD19 ⁺	B cell	0.5,	3.7	1.7
CD3 ⁻ CD16 ⁺ 56 ⁺ CD45 ⁺	NK cell	2.8,	7.9	1.3
CD14 ⁺ SCC ^{mid}	Monocyte	31.3,	2.7	6.0
Lin1 ⁻ CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	Myeloid DC	1.2,	0.3	0.1
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	Plasmacytoid DC	0.4,	0.3	0
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁻	Granulocyte	0.4,	0.2	0.1

図5. 臨床試験5例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



球 4.64%、脾細胞 5.21%から 3.34%、 $CD4^+CD127^{low}Foxp3^+$ 細胞は末梢血単核球 1.25%、脾細胞 1.13%から 3.62%へと変化したが、過去の症例とは異なる結果であった(表9)。表面抗原を解析の結果、 $CD4^+$ T細胞が 78.4%、 $CD8^+$ T細胞が 5.93%と T細胞が 84%以上を占めた。これに対し、B細胞、NK細胞はそれぞれ 1.7%、1.3%であった。また、単球は 6.0%であった。さらに、樹状細胞が 0.1%、顆粒球が 0.1%程度認められた(表10)。

誘導された制御性 T細胞を含む細胞が免疫抑制効果を示すか、MLR法を用いて検討した(図5)。 1×10^5 /well のレシピエント細胞、照射したドナー細胞に、培養細胞(0.03125×10^5 /well, 0.0625×10^5 /well, 0.125×10^5 /well, 0.25×10^5 /well)を加え共培養を行いチミジンの取り込みで評価した。MLRの結果(mean±SD)は、培養細胞を加えない(control)群(2721±1239)、培養細胞を 0.03125×10^5 /well 加えた群(6883±4006)、培養細胞を 0.0625×10^5 /well 加えた群(15519±1917)、培養細胞を 0.125×10^5 /well 加えた群(4065±3242)、培養細胞を 0.25×10^5 /well 加えた群(5843±1639)であった。更に、ドナー細胞を 3rd party に変更して同様の MLR

を行った。 3^{rd} party の MLR の結果は、培養細胞を加えない(control)群(26054 ± 5215)、培養細胞を 0.03125×10^5 /well 加えた群(19036 ± 5693)、培養細胞を 0.0625×10^5 /well 加えた群(17178 ± 1190)、培養細胞を 0.125×10^5 /well 加えた群(25095 ± 1429)、培養細胞を 0.25×10^5 /well 加えた群(30686 ± 7331)であった。この結果は小規模試験と乖離した結果であり、制御性 T細胞の割合が少ない事によるもの可能性があると考えられた。

臨床試験症例#6

総リンパ球数は培養前の末梢血単核球 3.55×10^9 、脾細胞 0.825×10^9 から 2週間培養後に 1.18×10^9 となった。

表面抗原の解析により、これらのリンパ球の表現型解析を行うと、 $CD3^+CD4^+$ 細胞は 2週間培養により、末梢血単核球 43.8%、脾細胞 10.7%から 64.1%へと上昇を認めた。一方、制御性 T細胞である $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 細胞は、末梢血単核球 1.02%、脾細胞 1.07%から 13.7%へと上昇した。更に $CD4^+$ 細胞中の比率を見ると、 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 細胞は末梢血単核球 5.66%、脾細胞 4.20%から 35.9%、 $CD4^+CD25^+CTLA4^+$ 細胞は末梢血単核

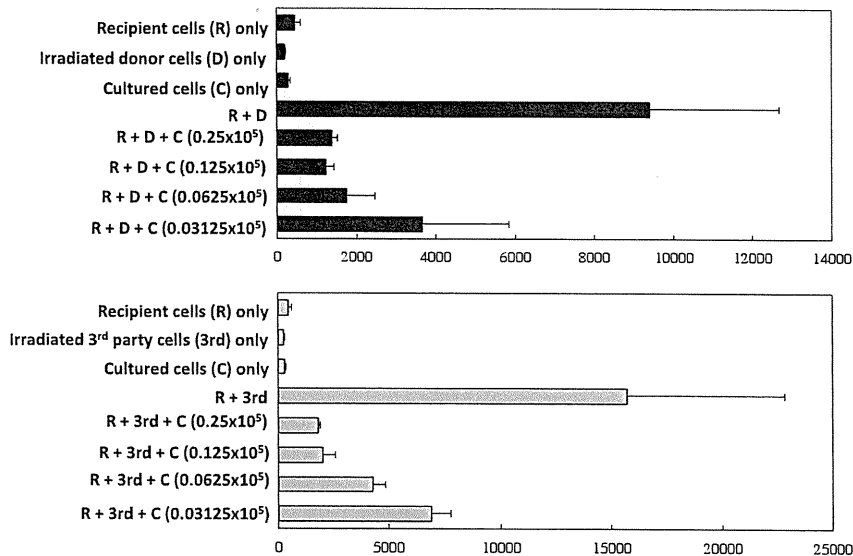
表 11. 臨床試験6例目の培養細胞のデータ(細胞数・Treg phenotype)

	培養開始時	1週間培養後	2週間培養後
リンパ球数 ($\times 10^9$) (生細胞率%)	PBMCs Splenocytes 3.55, 0.825 (99.8) (92.2)	1.896 (91.6)	1.18 (93.7)
Donorリンパ球数 ($\times 10^9$)	3.43	3.43	-
$CD3^+CD4^+$ (%)	43.8, 10.7	-	64.1
$CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (%)	1.02, 1.07	-	13.7
$CD4^+CD25^+Foxp3^+/CD4^+$ (%)	5.66, 4.20	-	35.9
$CD4^+CD25^+CTLA4^+/CD4^+$ (%)	2.44, 6.02	-	27.7
$CD4^+CD127^{low}Foxp3^+/CD4^+$ (%)	6.28, 7.24	-	30.2

表 12. 臨床試験6例目の培養細胞のデータ(細胞phenotypeのTable)

Phenotype	細胞種	培養前 (%)		2週間培養後 (%)
		PBMCs	Splenocytes	
CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD4 ⁺ T cell	43.8,	10.7	64.1
CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ T cell	15.9,	5.0	16.4
CD3 ⁻ CD19 ⁺	B cell	3.76,	5.46	5.02
CD3 ⁻ CD16 ⁺ 56 ⁺ CD45 ⁺	NK cell	4.43,	6.06	6.98
CD14 ⁺ SCC ^{mid}	Monocyte	9.12,	1.21	2.55
Lin1 ⁻ CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	Myeloid DC	0.51,	0.04	0.30
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	Plasmacytoid DC	0.10,	0.04	0.02
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁻	Granulocyte	0.66,	0.10	0.18

図 6. 臨床試験6例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



球 2.44%、脾細胞 6.02%から 27.7%、CD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺細胞は末梢血単核球 6.28%、脾細胞 7.24%から 30.2%へとそれぞれ上昇した(表 1 1)。表面抗原を解析の結果、CD4⁺ T 細胞が 64.1%、CD8⁺ T 細胞が 16.4%と T 細胞が 80%以上を占めた。これに対し、B 細胞、NK 細胞はそれぞれ 5.02%、6.98%であった。また、単球は 2.55%であった。さらに、樹状細胞が 0.32%、顆粒球が 0.18%程度認められた(表 1 2)。

誘導された制御性 T 細胞を含む細胞が免疫抑制効果を示すか、MLR 法を

用いて検討した(図 6)。1x10⁵/well のレシピエント細胞、照射したドナー細胞に、培養細胞(0.03125x10⁵/well, 0.0625x10⁵/well, 0.125x10⁵/well, 0.25x10⁵/well)を加え共培養を行いチミジンの取り込みで評価した。MLR の結果(mean±SD)は、培養細胞を加えない(control)群(9410±3276)、培養細胞を 0.03125x10⁵/well 加えた群(3648±2179)、培養細胞を 0.0625x10⁵/well 加えた群(1744±721)、培養細胞を 0.125x10⁵/well 加えた群(1241±196)、培養細胞を 0.25x10⁵/well 加えた群(1377±144)であった。更に、ドナー細胞を 3rd party に

変更して同様の MLR を行った。3rd party の MLR の結果は、培養細胞を加えない(control)群(15724±7129)、培養細胞を 0.03125x10⁵/well 加えた群(6863±871)、培養細胞を 0.0625x10⁵/well 加えた群(4246±561)、培養細胞を 0.125x10⁵/well 加えた群(2006±578)、培養細胞を 0.25x10⁵/well 加えた群(1779±145)であった。

臨床試験症例#7

総リンパ球数は培養前の末梢血単核球 7.27×10⁹、脾細胞 0.48×10⁹ から 2 週間培養後に 2.59×10⁹ となった。

表面抗原の解析により、これらのリ

ンパ球の表現型解析を行うと、CD3⁺CD4⁺細胞は 2 週間培養により、末梢血単核球 41.3%、脾細胞 34.7% から 64.0%へと上昇を認めた。一方、制御性 T 細胞である CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞は、末梢血単核球 3.39%、脾細胞 3.48%から 10.3%へと上昇した。更に CD4⁺細胞中の比率を見ると、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞は末梢血単核球 6.99%、脾細胞 8.04%から 19.2%、CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺細胞は末梢血単核球 4.80%、脾細胞 6.46%から 15.1%、CD4⁺CD127^{low}Foxp3⁺細胞は末梢血単核球 8.38%、脾細胞 8.37%から 18.0%へとそれぞれ上昇した(表 13)。表面

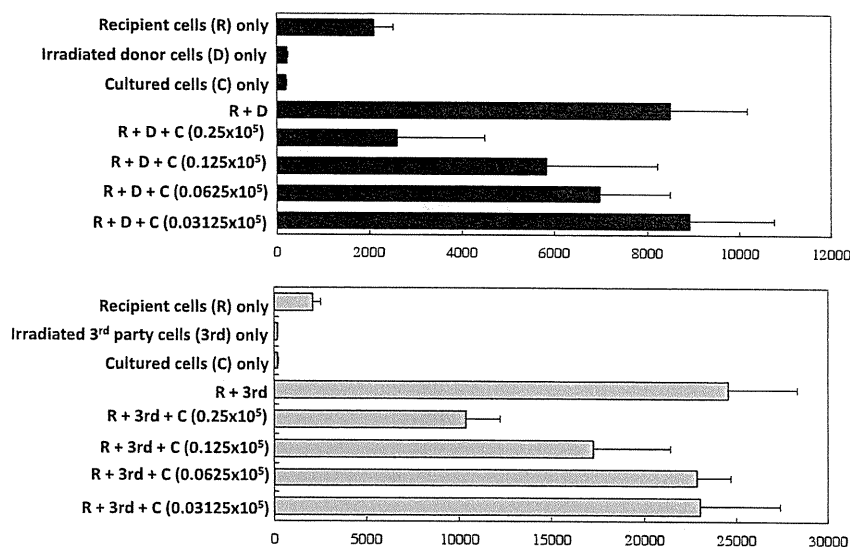
表 13. 臨床試験7例目の培養細胞のデータ(細胞数・Treg phenotype)

	培養開始時	1週間培養後	2週間培養後
リンパ球数 (x10 ⁹) (生細胞率%)	PBMCs 7.27, 0.48 (99.2), (100)	4.56 (93.6)	2.59 (94.3)
Donorリンパ球数 (x10 ⁹)	3.79	3.79	-
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	41.3, 34.7	-	64.0
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (%)	3.39, 3.48	-	10.3
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	6.99, 8.04	-	19.2
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	4.80, 6.46	-	15.1
CD4 ⁺ CD127 ^{low} Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	8.38, 8.37	-	18.0

表 14. 臨床試験7例目の培養細胞のデータ(細胞phenotypeのTable)

Phenotype	細胞種	培養前 (%)		2週間培養後 (%)
		PBMCs	Splenocytes	
CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD4 ⁺ T cell	41.3,	34.7	64.0
CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ T cell	11.7,	10.5	17.0
CD3 ⁺ CD19 ⁺	B cell	5.96,	15.9	7.94
CD3 ⁺ CD16 ⁺ 56 ⁺ CD45 ⁺	NK cell	15.3,	11.1	8.21
CD14 ⁺ SCC ^{mid}	Monocyte	5.01,	1.52	1.43
Lin1 ⁺ CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	Myeloid DC	0.62,	1.02	0.44
Lin1 ⁺ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	Plasmacytoid DC	0.78,	0.29	0.02
Lin1 ⁺ CD123 ⁺ HLA-DR ⁻	Granulocyte	0.80,	0.48	0.06

図7. 臨床試験7例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



抗原を解析の結果、CD4⁺ T 細胞が 64.0%、CD8⁺ T 細胞が 17.0%と T 細胞が 81%以上を占めた。これに対し、B 細胞、NK 細胞はそれぞれ 7.94%、8.21%であった。また、単球は 1.43%であった。さらに、樹状細胞が 0.46%、顆粒球が 0.06%程度認められた (表 1 4)。

誘導された制御性 T 細胞を含む細胞が免疫抑制効果を示すか、MLR 法を用いて検討した (図 7)。1x10⁵/well のレシピエント細胞、照射したドナー細胞に、培養細胞 (0.03125x10⁵/well, 0.0625x10⁵/well, 0.125x10⁵/well, 0.25x10⁵/well) を加え共培養を行いチミジンの取り込みで評価した。MLR の結果(mean±SD)は、培養細胞を加えない(control)群(8499±1684)、培養細胞を 0.03125x10⁵/well 加えた群(8911±1863)、培養細胞を 0.0625x10⁵/well 加えた群(6971±1521)、培養細胞を 0.125x10⁵/well 加えた群(5810±2416)、培養細胞を 0.25x10⁵/well 加えた群(2585±1890)であった。更に、ドナー細胞を 3rd party に変更して同様の MLR を行った。3rd party の MLR の結果は、培養細胞を加えない (control) 群

(24604±3476)、培養細胞を 0.03125x10⁵/well 加えた群(23011±4411)、培養細胞を 0.0625x10⁵/well 加えた群(22858±1823)、培養細胞を 0.125x10⁵/well 加えた群(17267±4158)、培養細胞を 0.25x10⁵/well 加えた群(10324±1899)であった。

臨床試験 8 例目

総リンパ球数は培養前の末梢血単核球 4.58×10⁹、脾細胞 0.564×10⁹ から 2 週間培養後に 0.695×10⁹ となった。

表面抗原の解析により、これらのリンパ球の表現型解析を行うと、CD3⁺CD4⁺細胞は 2 週間培養により、末梢血単核球 32.3%、脾細胞 28.0%から 67.6%へと上昇を認めた。一方、制御性 T 細胞である CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞は、末梢血単核球 5.46%、脾細胞 2.73%から 43.8%へと上昇した。更に CD4⁺細胞中の比率を見ると、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞は末梢血単核球 16.9%、脾細胞 9.75%から 64.8%、CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺細胞は末梢血単核球 14.8%、脾細胞 12.5%から 65.0%、CD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺細胞は末梢血単核球 19.5%、脾細胞 15.0%から 66.0%へ

表15. 臨床試験8例目の培養細胞のデータ(細胞数・Treg phenotype)

	培養開始時	1週間培養後	2週間培養後
リンパ球数 (x10 ⁹) (生細胞率%)	PBMCs Splenocytes 4.58, 0.564 (98), (100)	3.74 (86.6)	0.695 (89.5)
Donorリンパ球数 (x10 ⁹)	3.13	3.13	-
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	32.3, 28.0	-	67.6
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (%)	5.46, 2.73	-	43.8
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	16.9, 9.75	-	64.8
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	14.8, 12.5	-	65.0
CD4 ⁺ CD127 ^{low} Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	19.5, 15.0	-	66.0

表16. 臨床試験8例目の培養細胞のデータ(細胞phenotypeのTable)

Phenotype	細胞種	培養前 (%)		2週間培養後 (%)
		PBMCs	Splenocytes	
CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD4 ⁺ T cell	32.3,	28.0	67.6
CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ T cell	5.44,	12.0	9.97
CD3 ⁻ CD19 ⁺	B cell	10.7,	32.1	6.58
CD3 ⁻ CD16 ⁺ 56 ⁺ CD45 ⁺	NK cell	10.25,	12.5	4.51
CD14 ⁺ SCC ^{mid}	Monocyte	26.2,	8.4	4
Lin1 ⁻ CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	Myeloid DC	0.803,	1.41	0.434
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	Plasmacytoid DC	0.978,	2.28	0.06
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁻	Granulocyte	3.54,	0.471	0.01

とそれぞれ上昇した(表15)。表面抗原を解析の結果、CD4⁺T細胞が67.6%、CD8⁺T細胞が9.97%とT細胞が76%以上を占めた。これに対し、B細胞、NK細胞はそれぞれ6.58%、4.51%であった。また、単球は4%であった。さらに、樹状細胞が0.494%、顆粒球が0.01%程度認められた(表16)。

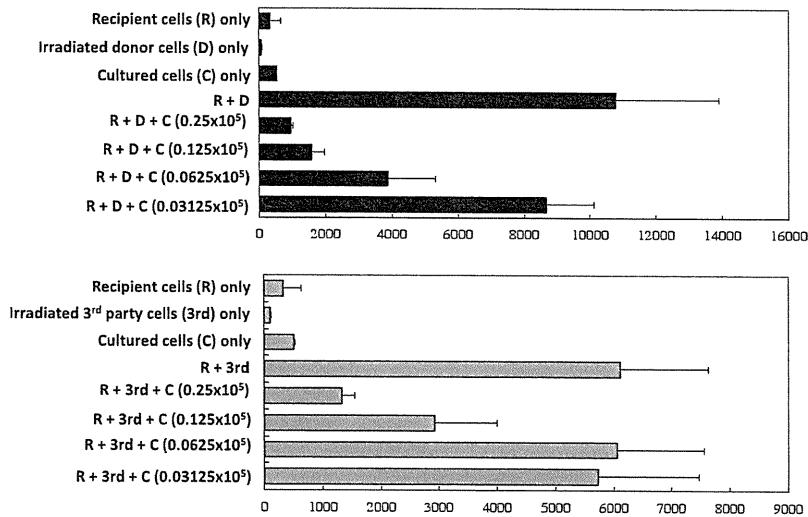
誘導された制御性T細胞を含む細胞が免疫抑制効果を示すか、MLR法を用いて検討した(図8)。1x10⁵/wellのレシピエント細胞、照射したドナー細胞に、培養細胞(0.03125x10⁵/well, 0.0625x10⁵/well, 0.125x10⁵/well,

0.25x10⁵/well)を加え共培養を行いチミジンの取り込みで評価した。MLRの結果(mean±SD)は、培養細胞を加えない(control)群(10780±3125)、培養細胞を0.03125x10⁵/well加えた群(8670±1457)、培養細胞を0.0625x10⁵/well加えた群(3879±1442)、培養細胞を0.125x10⁵/well加えた群(1563±417)、培養細胞を0.25x10⁵/well加えた群(956±62)であった。更に、ドナー細胞を3rd partyに変更して同様のMLRを行った。3rd partyのMLRの結果は、培養細胞を加えない(control)群(6117±1509)、培養細胞を0.03125x10⁵/well加えた群(5734±1738)、

培養細胞を 0.0625×10^5 /well 加えた群 (6056 ± 1508)、培養細胞を 0.125×10^5 /well 加えた群 (2918 ± 1076)、培養細胞を 0.25×10^5 /well 加えた群 (1333 ± 225)であった。

から 8 例目までの 5 例は、培養後の制御性 T 細胞の割合が平均で 17.8 (± 13.3)%と脾細胞添加前の 3 例の 11.5 (± 7.29)%に対して有意差はないものの多く誘導されている。これには、末梢

図8. 臨床試験8例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



D. 考察

本年度においては臨床試験 4 例目から 8 例目まで 5 例を行った。4 例目以降は肝移植当日に摘出した脾臓を細切しホモジナイザーで処理して、場集田らの原法に則りナイロンウールを通して T 細胞の割合を増加させて回収し、翌日に共培養に添加した。

脾臓から回収し添加した細胞の細胞数は平均 0.7×10^9 ($\pm 0.3 \times 10^9$)、生存率は平均 96.4 (± 0.3)%と問題を認めなかった。また、細胞種の割合は $CD4^+$ T 細胞が平均 20.0 (± 9.7)%と末梢血単核球の 35.5 (± 6.2)%に対して有意に低く、B 細胞は 14.8 (± 10.2)%と末梢血単核球の 6.8 (± 4.4)%に対して高い傾向であった。また、 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ 制御性 T 細胞については平均で 2.0 (± 1.0)%と末梢血単核球の 2.8 (± 1.7)%とほぼ変わらない割合であった。しかし、臨床試験 4 例目

血に存在する T 細胞に比較して脾臓の T 細胞は未成熟であることが寄与している可能性が考えられた。また、もう一つの機序としては、B 細胞の割合が多く、これらが抗原提示細胞として機能することが制御性 T 細胞の誘導に関与している可能性も考えられた。

臨床試験 5 例目は培養後の制御性 T 細胞の割合が 2.22%と他の症例に比較して低かった。また、MLR で評価した免疫制御能も全ての設定した細胞数において認められなかった。原因としては、当該症例は兄弟間で行われた HLA full match の肝移植症例であり、共培養の際に抗原提示細胞と $CD4^+$ T 細胞の間の主刺激が十分に行われず、それが制御性 T 細胞の誘導を妨げた可能性がある。

また、臨床試験 8 例目については、培養後の細胞において、制御性 T 細胞マーカーを示す T 細胞の著しい増加を認めたが、MLR 抑制能を検討したところ、その免疫制御能は responder お

よび stimulator の 1/32 の細胞量となる
と MLR は抑制されなくなり、過去の
症例のものと変わりはなかった。この
理由として Foxp3 や CTLA 4 を発現す
る全ての細胞が必ずしも制御性に働く
わけではない可能性や、responder の反
応性が高く、そのためにより必要な制
御性細胞の割合が増加している可能性
も考えられた。

E. 結論

肝移植症例計 8 例において、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を、4 例目
以降にはレシピエント由来脾細胞を加
え、抗 CD80 抗体および抗 CD86 抗体
存在下に 2 週間共培養することで、
CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺、CD4⁺CD127^{lo}
Foxp3⁺ 制御性 T 細胞が高率に誘導さ
れた。これら誘導された制御性 T 細胞
は *in vitro* において比較的抗原特異的
に MLR を抑制した。培養細胞輸注に
よる明らかな副作用は認められず、本
制御性 T 細胞を用いる細胞治療の安全
性も確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 実用新案登録

なし

2. その他

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）
総括研究報告書

「制御性T細胞治療による臨床肝移植後の免疫寛容誘導の試み」

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・教授
研究分担者：山下 健一郎
北海道大学 大学院医学研究科 移植外科・准教授
研究分担者：寺岡 慧
国際医療福祉大学 熱海病院・教授
研究分担者：上本 伸二
京都大学 大学院医学研究科 移植外科・教授

研究要旨：生体肝移植において、抗CD80抗体および抗CD86抗体を用い*ex vivo*で誘導した制御性T細胞を用いた新しい免疫抑制療法の臨床試験を8症例に対し施行した。輸注培養細胞量を増やすべく、4例目以降はレシピエント由来の脾細胞も併用し投与した。細胞輸注に伴う副作用は認められず、全例で安全に臨床試験を施行し得た。昨年度からの検討結果を踏まえ、本細胞治療に使用するエンドキサンは40 mg/kg, 1回投与を標準とした。本細胞治療プロトコールではCMV感染を来す可能性が高く、予防薬投与が必須であることが示された。肝移植後はプログラフ・セルセプト・ステロイドの3剤で免疫抑制を維持したが、全例において術後3ヶ月以内にセルセプトおよびステロイドは中止し、カルシニューリン阻害剤単独投与となった。8症例中3例で拒絶反応が認められたものの、2症例は免疫抑制剤中止もしくは減量最中でありその程度も軽微で、全例で治療に速やかに反応し肝機能は安定した。術後1年以上経過した3症例は、CNIを少量かつ週2回のみ投与で拒絶反応を認めずに肝機能は良好に推移しており、免疫寛容誘導が期待される。

A. 目的

本研究では、生体肝移植においてドナー抗原特異的な制御性T細胞を体外（*ex-vivo*）で誘導してこれを肝移植後に輸注し、免疫抑制剤の減少に対する効果と本治療法の安全性を評価する。

B. 方法

(1) ドナーの検査

ドナーとしての適格性を判定するため、移植前に以下の諸検査を行う。

(a) 1次スクリーニング

①CT・超音波（肝胆膵）CTはmulti-detector 3phase CTにて3次元での血管分岐形態を確認。

②採血（CBC、肝機能、HBV、HCV、腫瘍マーカー）

(b) 2次スクリーニング

①精神科受診

②第3内科受診

③胸腹部XP

④ECG・呼吸機能検査

⑤採血（ウイルス検査、腫瘍マーカー、凝固系、血液型、不規則抗体等）

⑥麻酔科受診

⑦自己血輸血(必要ならば行う)

(2) 患者（レシピエント）の検査
レシピエントとしての適格性を判定するため、移植前に以下の諸検査を行う。

(a) 血液検査、尿・便検査

①一般：CBC、血液像、血液型、不規則抗体スクリーニング

②肝機能：TP、Alb、T-Bil、D-Bil、ZTT、TTT、GOT、GPT、LDH、ALP、 γ -GTP、LAP、ChE、T-Cho、TG、CPK、NH₃、胆汁酸

③内分泌：FT₃、FT₄、TSH、TgAb、TPOAb、TSH receptor Ab、S-Amy、U-Amy、FBS、HBA1c

④腎機能：BUN、Cr、UA、Na、K、Cl、Ca、Mg、P、Na、Ccr

⑤凝固系：PT、PT-s、INH、aPTT、Fbg、AT-III、FDP、D-dimer

⑥感染症：HBsAg、HBcAb（←+ならHBsAb、HBeAg、HbeAb、HB-DNA(PCR法)^{*1}、HCV-Ab(HCV-RNA(定量,定性)、HCV-genotype)^{*2}、HTLV-1、HIV、梅毒 RPR 法定性、梅毒 TPLA 定性

⑦ウイルス：CMV-IgG、CMV-IgM^{*3}、HSV-IgG、HSV-IgM、VZV-IgG、VZV-IgM、EBV-IgG、EBV-IgM^{*4}

⑧真菌、原虫：カンジダ抗原、 β -Dグルカン^{*5}、トキソ IgG、トキソ IgM

⑨腫瘍マーカー：CEA、AFP、AFP-L3、CA19-9、PIVKA-II、DUPAN-II

⑩免疫系：PPD（ツ反）、ツ IgG、IgM、IgA、IgE、CH-50、C3、C4

⑪自己抗体系：抗核抗体、RF、ASO、CRP、AMA(AMA-M2)^{*6}

⑫その他：血清鉄、フェリチン、S-Cu、U-Cu、セルロプラスミン(一日尿中Cu)^{*8}、中ラズミン1アンチトリプシン(1アンチキモトリプシン)^{*7}、prealbumin、RBP、transferrin、レニン、アルドステロン、VitD、PTH-i、オステオカルシン、血中 β 2-MG

⑬尿検査：尿糖、尿蛋白、尿沈渣、尿中NTx、尿中 β 2-MG、25(OH)-VitD

⑭便潜血：オルトトリジン、グアヤック、ラテックス

*1 HBsAg(+),もしくはHBcAb(+)
の場合にHBs Ab, Hbe Ag, Hbe Ab,
HB-DNA(PCR法)を測定する。

*2 HCVAb(+)
の場合にはHCV-RNA
定量、定性、HCV-genotype
(検査科にgenotype測定を依頼)
を測定する。

*3 CMV-IgM(+)
の時にはCMV
antigenemia C10, C11
を測定する。

*4 EBV-IgM(+)
の時にはEBV
PCRを測定する。
(SRLに校費負担で提出)

*5 真菌感染が疑われる場合、
PCR(三菱)による抗原検査を
実施する。

*6 PBCの場合抗ミトコンドリア
抗体分画(AMA-M2)を追加。

*7 α 1-AT欠損症の場合は α 1-
アンチキモトリプシンを測定
する。(校費負担)

*8 Wilson病の場合、1日尿中
Cu排出量を測定。(治療前と
治療後)

その他

1) シトルリン血症の場合は血中シ
トルリン濃度と肝組織中アルギニ
ンコハク酸合成酵素
を測定する。

2) HCV の genotype

(b) 画像診断

①胸部 X-ray、腹部 X-ray

②腹部 US：放射線科依頼—門脈の開存性、径、血流方向。腫瘍の有無など。

③胸部～腹部 CT：胸部～骨盤腔を含める。

*上腹部は血管走行を見るため下記の Multidetector row CT による 3 phase 画像

胸部、下腹部、骨盤腔は delay phase のみで良い。

④腹部 dynamic MRI

⑤頭部 MRI (精神科受診)

⑥脳波 (精神科受診)

⑦上部消化管内視鏡

<画像診断の追加検査>

・40才以上の女性の場合：マンモグラフィー

・40才以上の場合：大腸内視鏡

・肝細胞癌の場合

各種検査、他科受診の前に脈管侵襲の有無をまずチェックする。

次いで遠隔転移の有無(骨シンチ、胸部 CT、頭部 MRI)を検査する。

Micrometastasis の概念から末梢血、骨髄血の AFP-mRNA について 3 回検索する。

Multidetector row CT による 3 phase 画像を行う。

CT-AP に関しては、患者によりその施行を決定する。

脈管の閉塞、異常が疑われた場合：MRI-Angio、血管造影、超音波血管内エコー

(c) 呼吸循環器系検査

①呼吸機能検査(DLCO 検査を同時に実施する)

②肺内シャント率測定：A-aDO₂ ならびに PaO₂ (FiO₂ 1.0)も評価する

③心電図

④心エコー：30才以上は必須。小児の場合は小児科心臓班に依頼する。

⑤血液ガス分析：room air で検査する。

<肺高血圧症が疑われた場合>

収縮期肺動脈圧(SPAP)が 30mmHg 以上の場合：術前に Prostacycline の持続投与が必要になるため、右心カテでの測定が必要となる。

(d) 他科受診による評価

①循環器内科：成人の心エコー検査

②耳鼻科：中耳炎、副鼻腔炎などの耳鼻科的感染症、疾患の有無。

③歯科：齲歯の有無及び治療。(保存補綴科)

④整形外科：胆汁うっ滞性肝疾患の場合に骨塩定量、体脂肪率による栄養評価

⑤婦人科：婦人科的感染症、子宮癌の有無。

⑥第3内科：上下の消化管内視鏡検査依頼、内科的適応評価

⑦精神科：小児例では両親がそろって受診。小児患者自身は脳波・MRI のみの受診。

⑧小児科：小児例では小児神経科、小児循環器(心エコー依頼)を受診

⑨麻酔科：全身麻酔実施可否の判断

(3) 生体肝移植の実施方法

生体ドナーの肝グラフト採取術および対象患者の肝移植術、ならびに生体ドナーと肝レシピエントの術後管理法は現在、北海道大学病院第一外科にて行っている標準的肝移植術および術後管理法に準じる。

(4) 肝移植後の検査

肝移植術後は、定期的な血液生化学検査および必要に応じて肝生検を行い、グラフトの機能や拒絶反応の有無を評