

Figure 2. Contribution of plasma factors to detection of CD8 α ⁺ monocytes. **A:** Whole blood samples (upper panel) and PBMCs separated from the same samples and resuspended in PBS (lower panel) were allowed to react with PE-labeled anti-CD8 α and FITC-labeled anti-CD14 (M5E2) mAbs and then served for FCM. PE-labeled mouse IgG1 and FITC-labeled mouse IgG2a were used as isotype-matched controls for the anti-CD8 α and anti-CD14 mAbs, respectively. Similar results were reproduced in three independent experiments. **B:** Reciprocal exchange of plasma and PBMCs was done between CD8 α ⁺ monocytes^{high} donor samples and CD8 α ⁺ monocytes^{low} donor samples. The PBMCs were resuspended in the autologous or allogeneic plasma and incubated for 20 min at 37°C and then made to react with PE-labeled anti-CD8 α and FITC-labeled anti-CD14 (M5E2) mAbs. PE-labeled mouse IgG1 and FITC-labeled mouse IgG2a were used as isotype-matched controls for the anti-CD8 α and anti-CD14 mAbs, respectively.

detected on monocytes are produced by monocytes, CD8 α ⁺ monocytes and CD8 α ⁻ monocytes were separated from whole blood samples, and then RT-PCR for CD8 α and CD8 β was conducted. The purity of CD8 α ⁺ monocytes and CD8 α ⁻ monocytes was 95.9% and 98.3%, respectively (Fig. 1D). Lymphocytes were also separated from the blood sample with 98.5% purity (data not shown). The RT-PCR showed that the mRNA expression of CD8 β was not detected in CD8 α ⁺ monocytes, though the CD8 α mRNA was weakly expressed in the cells (Fig. 1E). These findings corresponded with the previous data (5) and suggested that CD8 $\alpha\beta$ heterodimers detected on monocytes were not produced by monocytes.

Importance of Plasma Factors for Detection of CD8 α ⁺ Monocytes

Soluble CD8 in plasma was initially considered as a candidate molecule which was detected on monocytes. Although CD8 α ⁺ cells were detected at higher rates in monocytes when the anti-CD8 α mAb was added to whole blood samples, the rates of CD8 α ⁺ monocytes decreased when the anti-CD8 α mAb was added to PBMCs separated from the same blood samples and resuspended in PBS (Fig. 2A). These findings indicated that plasma was essential for the detection of CD8 α ⁺ monocytes. However, it seemed unlikely that plasma was a source of

CD8 $\alpha\beta$ heterodimers because the concentrations of soluble CD8 in plasma did not correlate with the rates of CD8 α ⁺ monocytes (Supporting Information Fig. 2). Thus, the possibility that plasma factors other than soluble CD8 contributed to the detection of CD8 α ⁺ monocytes was considered. To determine the contribution of putative plasma factors to the detection of CD8 α ⁺ monocytes, reciprocal exchange of plasma and PBMCs was done between blood samples exhibiting high proportion of CD8 α ⁺ monocytes (CD8 α ⁺ monocytes^{high} donor samples) and low proportion of CD8 α ⁺ monocytes (CD8 α ⁺ monocytes^{low} donor samples). Experiments were repeated using three independent sample combinations. The representative results are shown in Figure 2B. In the present sample combination, when PBMCs from a CD8 α ⁺ monocytes^{high} donor sample were resuspended in the autologous plasma, the rate of CD8 α ⁺ monocytes was 24.6%. Contrary to this, the rate of CD8 α ⁺ monocytes decreased to 3.43% when the same PBMCs were resuspended in the plasma of a CD8 α ⁺ monocytes^{low} donor sample. On the other hand, when PBMCs from a CD8 α ⁺ monocytes^{low} donor sample were resuspended in the plasma of a CD8 α ⁺ monocytes^{high} donor sample, the rate of CD8 α ⁺ monocytes increased to 38.8%, though the rate was 4.52% in the autologous plasma. These findings indicated that plasma factors other than soluble CD8 could be implicated in the detection of CD8 α ⁺ monocytes.

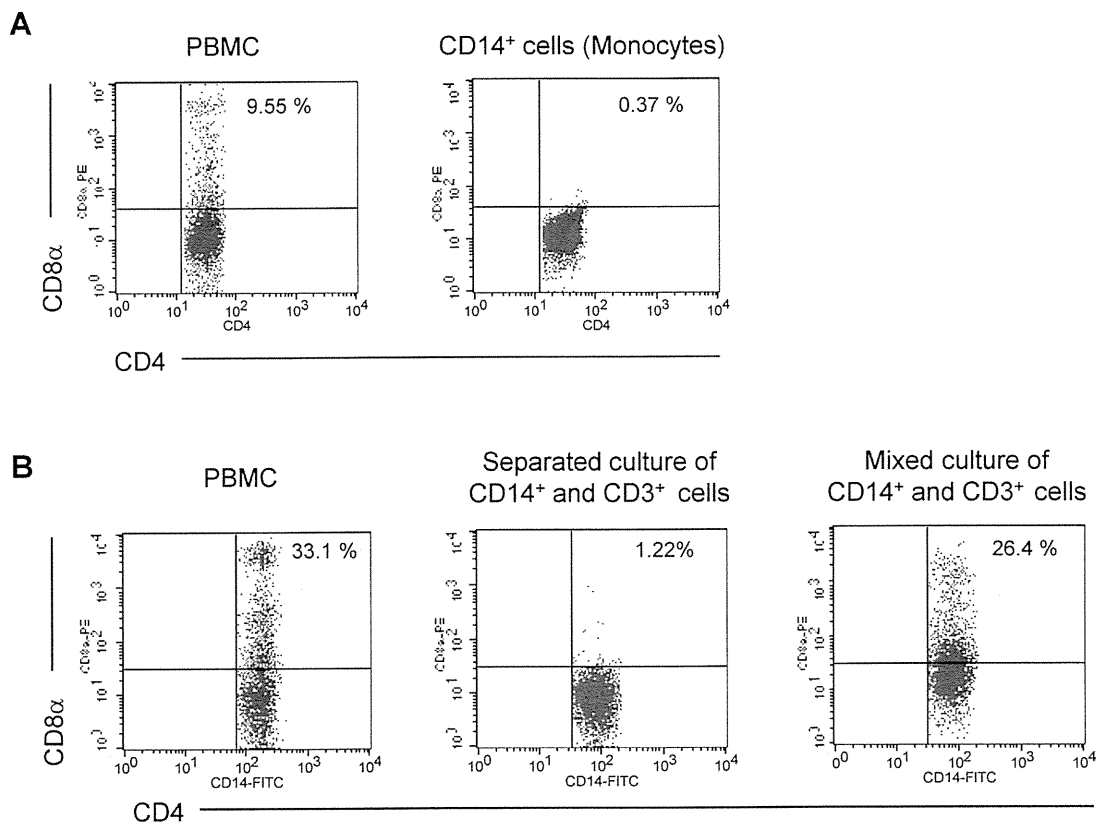


Figure 3. Requirement of cell-to-cell contact between monocytes and T cells for detection of CD8⁺ monocytes. **A:** PBMCs (left panel) and CD14⁺ monocytes (right panel) were separated from whole blood samples, resuspended in the autologous plasma, and incubated for 20 min at 37°C. After that, cells were made to react with PE-labeled anti-CD8α and FITC-labeled anti-CD4 mAbs and then served for FCM. PE- or FITC-labeled mouse IgG1 was used as isotype-matched control for the anti-CD8α or anti-CD4 mAb, respectively. Similar results were reproduced in three independent experiments. As same as Figure 1D, monocytes were identified as the CD4^{low} population in these experiments. **B:** PBMCs, CD14⁺ monocytes, and CD3⁺ T cells were separated from whole blood samples. PBMCs, and monocytes cultured with T cells for 20 min at 37°C, with or without a transwell chamber, were resuspended in the autologous plasma, followed by reaction with PE-labeled anti-CD8α and FITC-labeled anti-CD14 (M5E2) mAbs, and then served for FCM. PE-labeled mouse IgG1 and FITC-labeled mouse IgG2a were used as isotype-matched controls for the anti-CD8α and anti-CD14 mAbs, respectively.

Detection of CD8αβ Heterodimers from Cells in PBMCs Other than Monocytes

Next, CD8αβ heterodimers detected on monocytes were hypothesized to be recruited from cells other than monocytes. To elucidate the hypothesis, PBMCs and CD14⁺ monocytes were separated from whole blood samples, resuspended in the autologous plasma, and then incubated with the anti-CD8α mAb. As a result, the rates of CD8⁺ monocytes were decreased by the purification of monocytes compared when PBMCs were assayed (Fig. 3A). These findings indicated that CD8αβ heterodimers detected on monocytes were derived from cells in PBMCs other than monocytes. Since CD8αβ heterodimers are mainly expressed on CTLs (1), CD8αβ heterodimers detected on monocytes were speculated to be derived from T cells.

Need for Cell-to-Cell Contact Between Monocytes and T Cells for Detection of CD8⁺ Monocytes

To examine whether CD8αβ heterodimers detected on monocytes are derived from T cells and cell-to-cell contact between monocytes and T cells is required for the detection of

CD8⁺ monocytes, PBMCs, CD14⁺ monocytes, and CD3⁺ T cells were separated from whole blood samples. Then, monocytes and T cells were cocultured with or without a transwell chamber. Experiments were repeated three times independently. The representative results are shown in Figure 3B. In the present experiment, 33.1% of monocytes showed positive staining for CD8α when PBMCs were assayed in the autologous plasma. Interestingly, the rate of CD8⁺ monocytes was decreased to 1.22% when monocytes were separately cocultured with T cells using a transwell chamber. In contrast, 26.4% of monocytes were positive for CD8α when the monocytes were mixed together with T cells. These findings indicated that CD8αβ heterodimers detected on monocytes were derived from T cells and that cell-to-cell contact between monocytes and T cells was required for the detection of CD8⁺ monocytes.

Role of Fc Portion of Anti-CD8α mAb and FcγRII (CD32) on Monocytes in Detection of CD8⁺ Monocytes

Under the mixed culture condition, it was considered that the anti-CD8α mAb binding to CD8 on T cells linked

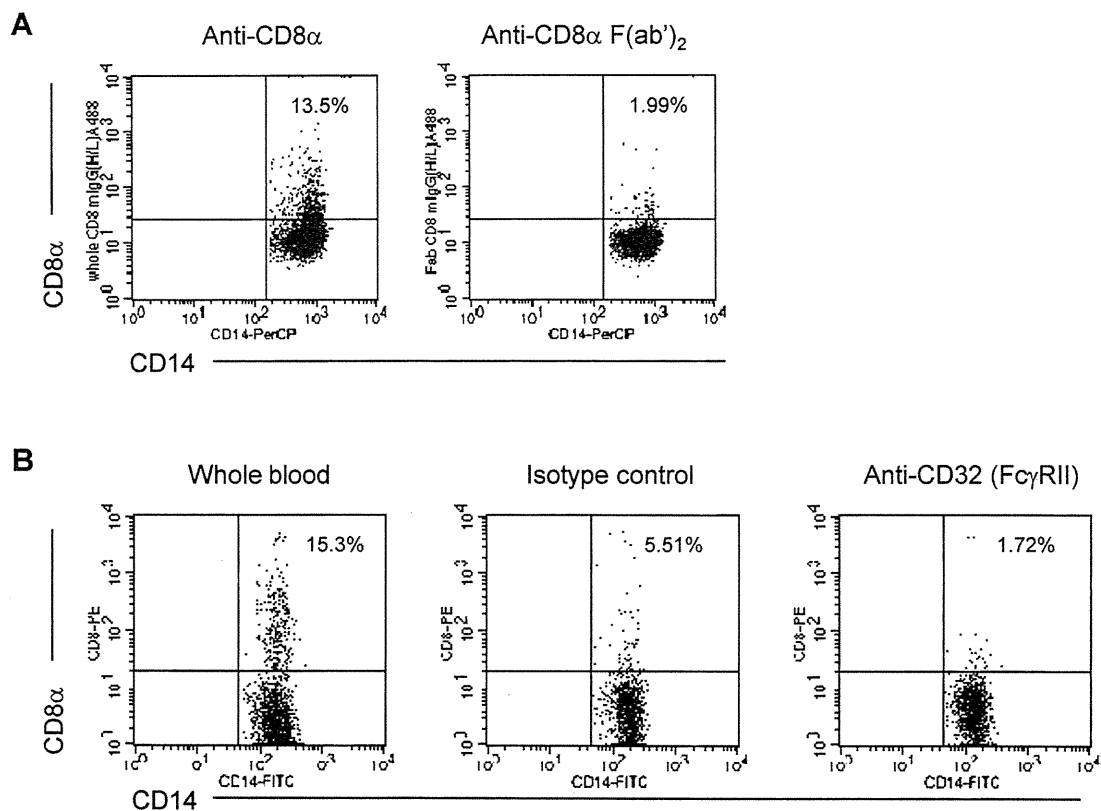


Figure 4. Involvement of Fc portion of anti-CD8 α mAb and Fc γ RII (CD32) on monocytes in the mechanism of CD8 translocation from T cells to monocytes. **A:** The anti-CD8 α mAb and control mouse IgG1 were enzymatically cleaved to F(ab')₂ fragments. F(ab')₂ fragments of the anti-CD8 α or untreated anti-CD8 α mAb and control F(ab')₂ fragments of mouse IgG1 or untreated mouse IgG1 were added to whole blood samples (100 μ L) for 20 min at room temperature, followed by depletion of erythrocytes. Then, the cells resuspended in PBS were allowed to react with 0.1 μ g of PerCP-labeled anti-CD14 (M ϕ P9) and 0.04 μ g of Alexa488-labeled anti-mouse IgG (H+L) Abs for 20 min at room temperature and then served for FCM. PerCP-labeled mouse IgG2b was used as isotype-matched control for the anti-CD14 mAb. Results were reproduced in a second experiment. **B:** Blocking assay for Fc γ RII (CD32) was conducted. Whole blood samples were incubated for 45 min at room temperature with the anti-CD32 (Fc γ RII) mAb, followed by depletion of erythrocytes. The cells resuspended in the autologous plasma were made to react with PE-labeled anti-CD8 α and FITC-labeled anti-CD14 (M5E2) mAbs and then served for FCM. PE-labeled mouse IgG1 and FITC-labeled mouse IgG2a were used as isotype-matched controls for the anti-CD8 α and anti-CD14 mAbs, respectively.

monocytes through the Fc portion of the mAb and cell surface Fc γ Rs, especially Fc γ RII (CD32), on monocytes (9). Initially, to assess the contribution of immunoglobulin Fc portion to the detection of CD8⁺ monocytes, F(ab')₂ of the anti-CD8 α mAb was generated. The digestion of Fc portion was verified by SDS-PAGE (data not shown). As expected, the rates of CD8⁺ monocytes were decreased by digestion of the Fc portion of the anti-CD8 α mAb (Fig. 4A). Next, to examine the contribution of Fc γ RII (CD32) on monocytes to the detection of CD8⁺ monocytes, blocking assay using the specific mAb to Fc γ RII (CD32) was conducted. Experiments were repeated three times independently. The representative results are shown in Figure 4B. Although the rates of CD8⁺ monocytes were decreased even by the isotype-matched mouse IgG1, the CD8⁺ rates were further decreased by the blocking of Fc γ RII (CD32). These findings indicated that the Fc of the anti-CD8 α mAb and Fc γ RII (CD32) on monocytes were implicated in the mechanism of detection of CD8⁺ monocytes. It is considered that the Fc portion of mouse IgG1 used as isotype-matched control could also bind to Fc γ RII (CD32) on monocytes,

resulting in the certain inhibitory effects on the detection of CD8⁺ monocytes.

Dynamism of Cell Membrane and Cytoskeleton in the Mechanism of Detection of CD8⁺ Monocytes

Monocytes exhibit phagocytic activity. When monocytes perform phagocytosis, the dynamic movement of cell membrane and cytoskeleton was observed. The dynamism of cell membrane and cytoskeleton was speculated to be required when CD8 molecules on T cells were transferred to monocytes. First, to investigate the contribution of dynamic movement of cell membrane, PBMCs were fixed by 4% PFA and analyzed in FCM. Histograms showed the fluorescence of latex beads involved in PBMCs with or without PFA fixation (Fig. 5A). These results showed that monocytes could no longer exhibit phagocytic activity after the PFA fixation. Correspondingly, the rates of CD8⁺ monocytes were decreased by the PFA fixation. Next, to examine the implication of actin recruitment in the detection of CD8⁺ monocytes, PBMCs were treated with CyD, which is a mycotoxin that inhibits

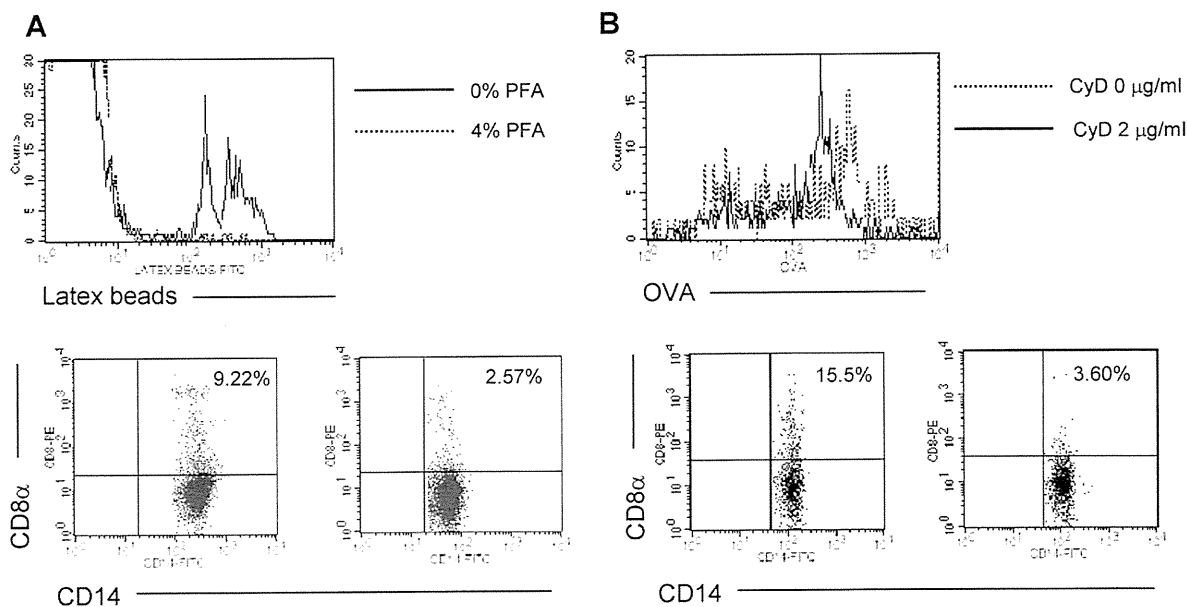


Figure 5. Requirement of dynamism of cell membrane and cytoskeleton for CD8 translocation from T cells to monocytes. **A:** PBMCs were fixed for 10 min by 4% PFA at room temperature. Yellow–green latex beads were added to PBMCs with or without PFA fixation. After incubation for 90 min at 37°C, cells were washed with cold PBS three times, and inclusion of yellow–green-labeled beads in PBMCs was analyzed in FCM (upper panel). Nonfixed or PFA-fixed PBMCs resuspended in the autologous plasma were allowed to react with PE-labeled anti-CD8 α and FITC-labeled anti-CD14 (M5E2) mAbs and then served for FCM (lower panels). PE-labeled mouse IgG1 and FITC-labeled mouse IgG2a were used as isotype-matched controls for the anti-CD8 α and anti-CD14 mAbs, respectively. **B:** PBMCs were treated with or without CyD (2 μ g/mL) for 30 min at 37°C. Then, OVA-FITC (250 μ g/mL) was added to PBMCs for 30 min at 37°C. Inclusion of OVA-FITC in PBMCs was analyzed in FCM (upper panel). PBMCs resuspended in the autologous plasma were treated with or without CyD (2 μ g/mL) for 30 min at 37°C, made to react with PE-labeled anti-CD8 α and FITC-labeled anti-CD14 (M5E2) mAbs, and then served for FCM (lower panels). PE-labeled mouse IgG1 and FITC-labeled mouse IgG2a were used as isotype-matched controls for the anti-CD8 α and anti-CD14 mAbs, respectively. Both experiments were repeated independently three times, and the representative results were shown.

actin polymerization. Histograms showed that the uptake of fluorescence-labeled OVA in PBMCs was decreased by the CyD treatment (Fig. 5B). Correspondingly, the rates of CD8⁺ monocytes were decreased by the CyD treatment. These findings indicated that dynamism of cell membrane and cytoskeleton was implicated in the detection of CD8⁺ monocytes.

Translocation of CD3 and $\alpha\beta$ TCR on T Cells with CD8 to Monocytes in Plasma and with Anti-CD8 α mAb

The fragment of plasma membrane of T cells, including CD8 $\alpha\beta$ heterodimers, was hypothesized to translocate to monocytes when T cells and monocytes coexisted in plasma and with anti-CD8 α mAb. To elucidate the hypothesis, it was examined whether CD8 and other cell surface molecules, such as CD3 and $\alpha\beta$ TCR, would be transferred. As expected, CD3 and $\alpha\beta$ TCR were transferred from T cells to monocytes accompanied by CD8 (Fig. 6A). These findings suggested that the fragment of plasma membrane, but not a certain molecule alone, was transferred from T cells to monocytes when these cells were bridged by Abs in plasma.

Translocation of Prelabeled CD8 $\alpha\beta$ Heterodimers on T Cells to Monocytes When Cocultured in Plasma

Finally, prelabeled CD8 $\alpha\beta$ heterodimers on T cells were hypothesized to transfer to monocytes when these cells were cocultured in plasma. Results clearly indicated that the fluo-

rescence-labeled CD8 $\alpha\beta$ heterodimers on T cells translocated to monocytes after these cells were incubated together in plasma (Fig. 6B).

DISCUSSION

Intercellular communication is essential for the development and maintenance of the immune system. To date, diverse scenarios of intercellular communication have been documented, including immunological synapses (11), membrane nanotubes (12), tunneling nanotubes (13), and microparticles (14). Immunological synapse is the interface between the APC and lymphocyte, which triggers the onset of specific immune response (11). Onfelts revealed the presence of membrane nanotubes bridging human monocyte-derived macrophages and supporting vesicular traffic of bacteria (12). Watkins and Salter reported that myeloid cells could transmit calcium signals to other cells through tunneling nanotubes (13). Microparticles are recognized as novel elements in intercellular communication under both physiological and pathological conditions (14).

Exchange of cell surface molecules in conjugates formed between immune cells is now termed trogocytosis (6). Trogocytosis was first described on CD8⁺ T cells as a TCR-mediated capture process of antigen (Ag)/MHC class I complex from APCs, which occurred subsequent to the formation of the immunological synapse (15,16). To date, various immune

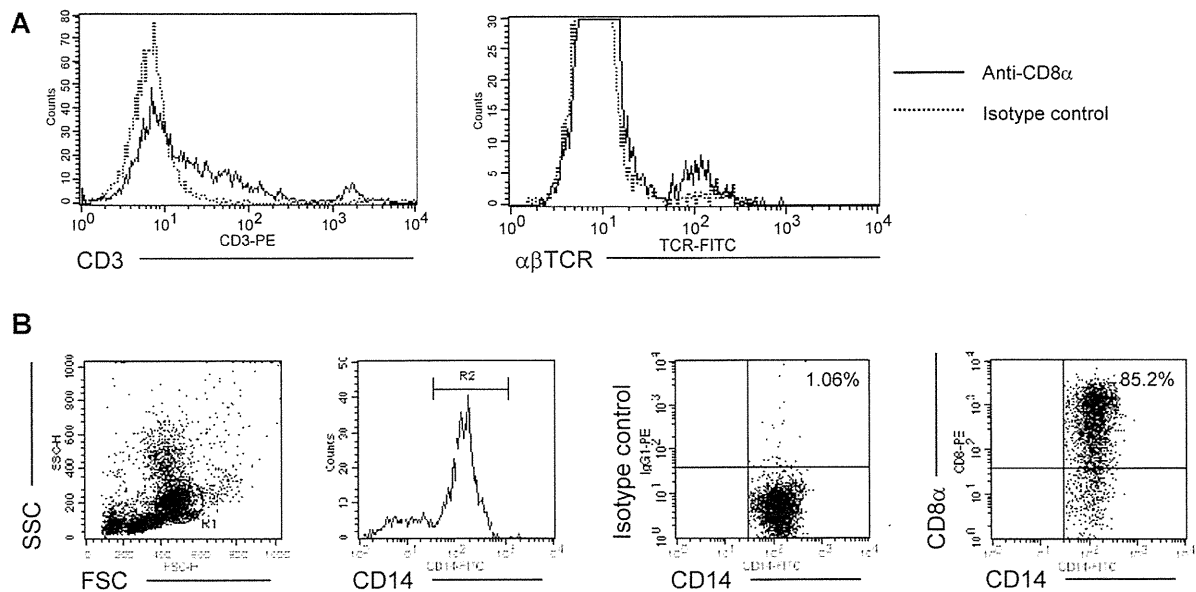


Figure 6. Translocation of CD3 and $\alpha\beta$ TCR from T cells to monocytes accompanied by CD8, and translocation of prelabeled CD8 molecules on T cells to monocytes. **A:** Heparinized peripheral blood samples were preincubated with the unlabeled anti-CD8 α mAb or control mouse IgG1, followed by depletion of erythrocytes. The cells resuspended in PBS were allowed to react with PE-labeled anti-CD3 and FITC-labeled anti-CD14 (M5E2) mAbs, or FITC-labeled anti- $\alpha\beta$ TCR and PerCP-labeled anti-CD14 (M ϕ P9) mAbs and then served for FCM. PE-labeled mouse IgG1, FITC-labeled mouse IgG1, FITC-labeled mouse IgG2a, and PerCP-labeled mouse IgG2b were used as isotype-matched controls for the anti-CD3, anti- $\alpha\beta$ TCR, anti-CD14 (M5E2), and anti-CD14 (M ϕ P9) mAbs, respectively. **B:** CD3⁺ T cells and CD14⁺ monocytes were separated from PBMCs as described in the section of "Materials and Methods." The T cells (1×10^6) were made to react with PE-labeled anti-CD8 α mAb or mouse IgG1 for 20 min at room temperature. After washing with PBS, the T cells mixed with monocytes (1×10^5) were resuspended in the autologous plasma for 20 min at 37°C and then allowed to react with FITC-labeled anti-CD14 (M5E2) mAb. These cells were served for FCM. FITC-labeled mouse IgG2a was used as isotype-matched control for the anti-CD14 mAb. Experiments were repeated independently three times, and the representative results were shown.

cells, including CD4⁺ T cells (17), B cells (17), $\gamma\delta$ T cells (18), NK cells (19), DCs (20), and monocytes/macrophages (21,22) are confirmed to perform trogocytosis. These cells can accept the plasma membrane fragments from partner cells after recognition of cell surface Ag on the partner cells by a specific receptor on the cell surface. Recently, another mechanism of trogocytosis mediated by Ag/Ab immune complexes and Fc γ Rs on acceptor cells was identified (6). This mechanism is well characterized as the phenomenon wherein CD20 molecules on malignant B cells are lost after infusion of the humanized anti-CD20 mAb, rituximab (23,24). In this situation, Fc γ R⁺ immune cells, such as monocytes, accept the CD20/anti-CD20 immune complexes from B cells.

In this study, CD8 α ⁺ monocytes in human peripheral blood samples were discovered by whole blood erythrocyte lysis method in FCM (Fig. 1A). Although Gibbins et al. showed that a small number of monocytes expressed CD8 $\alpha\alpha$ homodimers (5), our further investigation revealed that CD8 molecules detected on monocytes included not only CD8 $\alpha\alpha$ homodimers but also CD8 $\alpha\beta$ heterodimers (Figs. 1B and 1C). Since the CD8 β mRNA was not detected in CD8⁺ monocytes, it was hypothesized that CD8 $\alpha\beta$ heterodimers detected on monocytes might be derived from cells other than monocytes, especially T cells (Figs. 1D and 1E). Through this study, the hypothesis was proven correct, and the following findings were revealed: (1) plasma-dependent CD8 translocation from T cells to monocytes (Fig. 2), (2) importance of cell-to-cell

contact between T cells and monocytes for CD8 translocation (Fig. 3), (3) contribution of the Fc portion of the anti-CD8 mAb and Fc γ RII (CD32) on monocytes, as well as the involvement of dynamism of cell membrane and cytoskeleton (Figs. 4 and 5), and (4) translocation of CD3 and $\alpha\beta$ TCR from T cells to monocytes accompanied by CD8 (Fig. 6A). Furthermore, after coculturing monocytes with fluorescence-conjugated anti-CD8-labeled T cells, detection of the fluorescent signal on the monocytes was confirmed (Fig. 6B). These phenomena are consistent with the Ag/Ab immune complexes and Fc γ R-mediated trogocytosis (6).

The first important issue in this study is that plasma was found to be essential for the completion of this type of trogocytosis. Although the plasma factors that contributed to the exchange of cell surface molecules between T cells and monocytes were not identified, the concentrations and/or activities of the putative plasma factors could be related to the individual differences in the proportion of CD8⁺ monocytes in blood samples. Thus, identification of these plasma factors is one vital issue to be addressed in our future research.

Another important issue in this study is that Fc γ RII (CD32) on monocytes was critically implicated in the mechanism of trogocytosis when the anti-CD8 α mAb was used. It is known that Fc γ Rs, including Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), and Fc γ RIII (CD16), expressed on human monocytes are different in terms of binding affinity to mouse immunoglobulin subclasses and that mouse IgG1 shows the highest affinity to

Fc γ RII (CD32) (8,9). Since the anti-CD8 α mAbs used in this study were mouse IgG1, the contribution of Fc γ RII (CD32) to the CD8 translocation from T cells to monocytes was examined, and the crucial contribution of Fc γ RII (CD32) to mouse IgG1 Ab-mediated trogocytosis was verified. However, further investigations are needed to clarify whether Fc γ RII (CD32) is exclusively involved in the mechanism of Ab-mediated trogocytosis regardless of the immunoglobulin subclass.

Additionally, the dynamism of cell membrane and cytoskeleton was revealed to be associated with the mechanism of molecular translocation from T cells to monocytes. This finding is consistent with the observation that trogocytosis by monocytes/macrophages occurs in parallel with phagocytosis (6). Since CD8 molecules transferred from T cells to monocytes via the Ab- and Fc γ R-mediated trogocytosis showed dot-like rather than diffuse distribution (Supporting Information Fig. 1), it is possible that the transferred CD8 molecules were involved in the cytoplasm of monocytes. The investigation into the possibility is ongoing.

Although this study confirmed *in vitro* phenomenon, trogocytosis can undoubtedly occur *in vivo* (23). The production of autoantibodies for CTLs, including anti-CD8 Ab, is known in patients with systemic lupus erythematosus and human immunodeficiency virus infection (25,26). Depletion and functional impairment of CTLs occur among these patients, as well. The phenomenon shown here may imply one of the mechanisms that may explain the reduction or impairment of CTLs among these patients. The functional alterations of T cells with reduced cell surface molecules, such as CD8, and of monocytes with acquired T cell molecules are subjects of interest.

Finally, false positive results should be considered when monocytes were assayed by whole blood erythrocyte lysis method in FCM. Currently, the whole blood erythrocyte lysis method is the most common procedure in FCM. This method is quick and easy, utilizes small sample volume, and does not change the cellular fraction or require blocking reagents for Fc γ Rs. If unexpected molecules are detected on monocytes by this method, confirmation through other methods, such as by serving purified monocytes as samples for FCM, should be conducted.

LITERATURE CITED

- Reinherz EL, Schlossman SF. The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell* 1980;19:821–827.
- Chang HC, Tan K, Ouyang J, Parisini E, Liu JH, Le Y, Wang X, Reinherz EL, Wang JH. Structural and mutational analyses of a CD8 $\alpha\beta$ heterodimer and comparison with the CD8 $\alpha\alpha$ homodimer. *Immunity* 2005;23:661–671.
- Chang HC, Tan K, Hsu YM. CD8 $\alpha\beta$ has two distinct binding modes of interaction with peptide-major histocompatibility complex class I. *J Biol Chem* 2006;281:28090–28096.
- Baba T, Ishizu A, Iwasaki S, Suzuki A, Tomaru U, Ikeda H, Yoshiki T, Kasahara M. CD4⁺/CD8⁺ macrophages infiltrating at inflammatory sites: A population of monocytes/macrophages with a cytotoxic phenotype. *Blood* 2006;107:2004–2012.
- Gibbins DJ, Marcet-Palacios M, Sekar Y, Ng MC, Befus AD. CD8 α is expressed by human monocytes and enhances Fc γ R-dependent responses. *BMC Immunol* 2007;8:12.
- Daubeuf S, Lindorfer MA, Taylor RP, Joly E, Hudrisier D. The direction of plasma membrane exchange between lymphocytes and accessory cells by trogocytosis is influenced by the nature of the accessory cell. *J Immunol* 2010;184:1897–1908.
- Renzi P, Ginns LC. Analysis of T cell subsets in normal adults. Comparison of whole blood lysis technique to Ficoll-Hypaque separation flow cytometry. *J Immunol Methods* 1987;98:53–56.
- Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2001;19:275–290.
- Wee SL, Colvin RB, Phelan JM, Preffer FI, Reichert TA, Berd D, Cosimi AB. Fc-receptor for mouse IgG1 (Fc γ RII) and antibody-mediated cell clearance in patients treated with Leu2a antibody. *Transplantation* 1989;48:1012–1017.
- Pryjma J, Baran J, Ernst M, Woloszyn M, Flad HD. Altered antigen-presenting capacity of human monocytes after phagocytosis of bacteria. *Infect Immun* 1994;62:1961–1967.
- Friedl P, den Boer AT, Gunzer M. Tuning immune responses: Diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 2005;5:532–545.
- Onfelt B, Nedvetzki S, Benninger RK, Purbhoo MA, Sowinski S, Hume AN, Seabra MC, Neil MA, French PM, Davis DM. Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J Immunol* 2006;177:8476–8483.
- Watkins SC, Salter RD. Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubes. *Immunity* 2005;23:309–318.
- Distler JH, Huber LC, Hueber AJ, Reich CF, III, Gay S, Distler O, Pisetsky DS. The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages. *Apoptosis* 2005;10:731–741.
- Hudrisier D, Riond J, Mazarguil H, Gairin JE, Joly E. Cutting edge: CTLs rapidly capture membrane fragments from target cells in a TCR signaling-dependent manner. *J Immunol* 2001;166:3645–3649.
- Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 2001;15:751–761.
- Puau AL, Campanaud J, Salles A, Preville X, Timmerman B, Joly E, Hudrisier D. A very rapid and simple assay based on trogocytosis to detect and measure specific T and B cell reactivity by flow cytometry. *Eur J Immunol* 2006;36:779–788.
- Espinosa E, Tabiasco J, Hudrisier D, Fournie JJ. Synaptic transfer by human $\gamma\delta$ T cells stimulated with soluble or cellular antigens. *J Immunol* 2002;168:6336–6343.
- Roda-Navarro P, Reyburn HT. Intercellular protein transfer at the NK cell immune synapse: Mechanisms and physiological significance. *FASEB J* 2007;21:1636–1646.
- Russo V, Zhou D, Sartirana C, Rovere P, Villa A, Rossini S, Traversari C, Bordignon C. Acquisition of intact allogeneic human leukocyte antigen molecules by human dendritic cells. *Blood* 2000;95:3473–3477.
- Xu H, Dhanireddy KK, Kirk AD. Human monocytes as intermediaries between allogeneic endothelial cells and allospecific T cells: A role for direct scavenger receptor-mediated endothelial membrane uptake in the initiation of alloimmunity. *J Immunol* 2006;176:750–761.
- Harvey BP, Quan TE, Rudenga BJ, Roman RM, Craft J, Mamula MJ. Editing antigen presentation: Antigen transfer between human B lymphocytes and macrophages mediated by class A scavenger receptors. *J Immunol* 2008;181:4043–4051.
- Kennedy AD, Beum PV, Solga MD, DiLillo DJ, Lindorfer MA, Hess CE, Densmore JJ, Williams ME, Taylor RP. Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol* 2004;172:3280–3288.
- Li Y, Williams ME, Cousar JB, Pawluczukowicz AW, Lindorfer MA, Taylor RP. Rituximab-CD20 complexes are shaved from Z138 mantle cell lymphoma cells in intravenous and subcutaneous SCID mouse models. *J Immunol* 2007;179:4263–4271.
- Noguchi M, Iwamori M, Hirano T, Kobayashi S, Hashimoto H, Hirose S, Nagai Y. Autoantibodies to T and B cell lines detected in serum samples from patients with systemic lupus erythematosus with lymphopenia and hypocomplementemia. *Ann Rheum Dis* 1992;51:713–716.
- Daniel V, Susal C, Weimer R, Zipperle S, Kropelin M, Zimmermann R, Huth-Kuhne A, Gerhard I, Maier H, Opelz G. CD8⁺ lymphocyte decrease in HIV disease: Association with anti-CD4⁺ but not with anti-CD8⁺ lymphocyte autoantibodies. *Vox Sang* 1996;70:86–91.

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の治療法を 確立していくために—その現状と展望—

The current and future approaches to the treatment of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP)

山野嘉久 佐藤知雄 安藤 仁
新谷奈津美 八木下尚子

Abstract

Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a retrovirus that is the causative agent of a progressive neurological disease termed HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). HAM/TSP is a chronic neuroinflammatory disease characterized by spastic paraparesis, lower limb sensory disturbance and bladder/bowel dysfunction. Over the twenty-five years since the discovery of this disease, significant advancements have been made in the pathogenic mechanisms associated with HAM/TSP, however, little progress has been made in the treatment of this disorder. This review highlights the natural history of HAM/TSP, informative results of clinical trials, and discusses the current and future approaches to the treatment of HAM/TSP within the context of our understanding of the underlying pathogenic mechanisms.

Key words: HAM/TSP, natural history, biomarker, treatment, unmet medical needs

はじめに

ヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 感染症は疫学的に我が国に特有の感染症であり、感染者は全国で約100万人以上存在する。また、感染者の一部に神経難病であるHTLV-1関連脊髄症 (HAM) あるいは致死率の高い成人T細胞白血病 (ATL) を発症することから、その対策は厚生行政のうえでも重要課題であるにもかかわらず、十分な方策が講じられていなかったが、2010年、政府に‘HTLV-1特命チーム’が発足し、全国一律で公費による妊婦HTLV-1抗体検査、HTLV-1感染症やHAM、ATLなどの関連

疾患に対する総合的な対策‘HTLV-1総合対策’の実施が決まった。HAMは、進行性の痙性対麻痺を特徴とし、患者の生活の質が大きく損なわれる極めて深刻な難治性疾患である。HAMの発見から25年、これまでに病態研究は精力的に進められ多くのことが判明してきたが、治療に関するエビデンスは乏しく、そのため治療指針は不明確でありHAMの治療は混乱しているのが現状である。しかもHAMは欧米の先進国では患者数が少ないために、これらの地域での治療エビデンスはほとんど存在しない。先進国でHAM患者が多いのは日本のみであるため、治療法を確立していくために必要な治療エビデ

Yoshihisa Yamano, Tomoo Sato, Hitoshi Ando, Natsumi Araya, Naoko Yagishita: Department of Rare Diseases Research, Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 病因・病態解析部門

0047-1852/12/¥60/頁/JCOPY

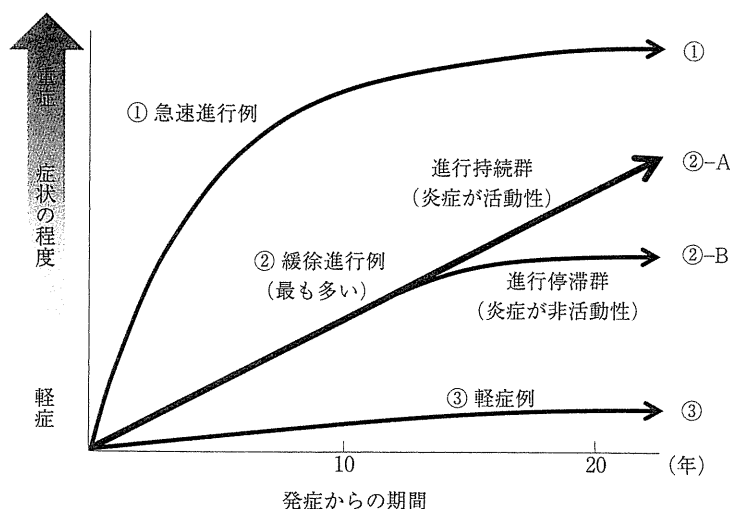


図1 HAMの臨床経過の特徴

ンスづくりに課せられた我が国の責務は大きい。

本稿では、このようにアンメットメディカルニーズの高いHAMの治療の現状をまとめ、これから治療法を確立していくために必要な課題や取り組みについて述べたい。

1. HAMの診療の現状

HAMは、1986年にOsameらにより一つの疾患単位として提唱され¹⁾、2009年度からは国の難治性疾患克服研究事業の対象疾患(いわゆる難病)に認定されている。最近の疫学調査では、全国のHAM患者数は約3,000例と推定され、関東などの大都市圏で患者数が増加していると報告されている。初期症状は、歩行の違和感、足のしびれ、つっぱり感、足がもつれる、走ると転びやすいなどであるが、多くは進行し、歩行困難、頻尿、尿閉、高度の便秘、時に両下肢の疼痛などが出現し、徐々に日常生活が困難になる。重症例では下肢の完全麻痺や体幹の筋力低下による座位保持困難により、寝たきりになる場合もある。

著者らは2007年4月から関東でHAM専門外来を開設し、これまで約100例のHAM患者を診療しているが、その診療を通して様々な問題点が浮かび上がってきた。例えば、発病してから診断までに時間がかかる、HAMの進行には

かなりの個人差のあることがまだあまり知られていない、疾患活動性を評価するための検査が実施されていない、治療を受けていない患者が多いなどである。このような問題の背景には、疾患の認知度の低さや、HAMの臨床経過に関する情報不足、疾患活動性の評価法や治療方針の決定に関する指針がない、治療エビデンスが少ないためガイドラインが確立されていないことなどが挙げられる。HAMのように希少な疾患は日常的に遭遇することは少なく、神経内科医でもHAMの診療に慣れていないことが多いのが現状であると思われ、HAMの円滑な治療を行うためには、早急な治療ガイドラインなどの作成とそれに資する臨床試験の実施が必要である。

2. HAMの経過の特徴

HAMの治療ガイドライン作成に必要な治療エビデンスの蓄積に向けた臨床試験を実施していくためには、まずHAMの経過の特徴を把握する必要がある。図1に示すように、HAMには‘経過に個人差が大きい’という特徴があるが、そのことは意外と知られていない。HAM患者の約8割は年単位で緩徐慢性に進行するが(②緩徐進行例)、この群は更に、症状の進行が持続する場合(②-A)と、経過の途中から比較的症狀の進行が停滞する場合(②-B)とに分かれ

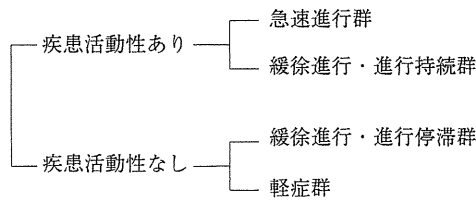


図2 HAMの病型分類(案)

る。また、症状が急速に進行し数カ月で歩行不能となる例もみられ(①急速進行例)、特に高齢者にこのような場合が多い傾向にある。一方で、運動障害が軽度のまま数十年以上の長期にわたり症状がそれほど進行しない例も認められる(③軽症例)。ごくまれにはあるが、比較的落ち着いた症例が感染や出産などを契機に症状が悪化する場合も認められる。

これらの特徴を考慮してHAMの病型を整理すると、図2に示すように、HAMは疾患活動性の高い群と低い群に大別され、更に疾患活動性の高い群は‘急速進行群’と‘緩徐進行群’に、また疾患活動性の低い群は‘進行停滞群’と‘軽症群’とに分類される(疾患活動性を判定するバイオマーカーについては後述する)。このようにHAMの疾患活動性や経過は患者ごとに大きく異なるので、治療方針を決定する際はこれらの特徴を考慮する必要がある。しかしながら、これまでこのような特徴に基づいた臨床試験は実施されておらず、今後はそれぞれの病型に応じた治療指針を作成するための臨床試験をデザインし実施していくことが求められる。

3. HAMの病態

HAMの疾患活動性を評価し、また治療薬開発や治療法を確立していくためには、HAMの病態の理解が重要である。

1) 病 理

HAMの病理組織所見では、慢性炎症過程が脊髄、特に胸髄中・下部を中心に起こっている。病変はほぼ左右対称性で、小血管周囲から脊髄実質にひろがる炎症細胞浸潤と周囲の脊髄実質、すなわち、髄鞘や軸索の変性脱落がみられる。主として両側側索に強くみられ、時に灰白質に

も及んでいる。その他の詳細な解析も含めて、HAM患者脊髄では細胞性免疫反応が持続的に起こっていることを示す所見が得られている。

更にHAMの脊髄病変において、HTLV-1感染細胞について *in situ* PCR法を用いて解析された結果、HTLV-1の感染は脊髄に浸潤したT細胞にのみ確認され、周辺の神経細胞やグリア細胞には確認されていない²⁾。このことは、浸潤したHTLV-1感染T細胞が慢性炎症の要因として中心的な役割を果たしていることを示唆している。

2) ウイルス・免疫学的な特徴

HAM患者では、末梢血単核球中のプロウイルス量、すなわちHTLV-1感染細胞数が無症候性キャリアに比較して有意に多いことが判明している³⁾。また、ウイルス感染細胞に反応するHTLV-1特異的細胞傷害性T細胞や抗体の量も異常に増加しており、ウイルスに対する免疫応答が過剰に亢進しているという免疫学的な特徴を有している⁴⁾。更に、脊髄病変局所や髄液中でウイルスの発現、一部の炎症性サイトカインやケモカインの産生が非常に高まっていることが知られている⁴⁾。

これらのウイルス・免疫学的特徴と病理学的な所見などを総合すると、HAMの主要な病態は、①HTLV-1感染細胞の増加、②脊髄の慢性炎症、③脊髄組織の破壊と変性と考えられる。すなわち図3に示すように、HTLV-1感染細胞が脊髄へ遊走してウイルス発現により炎症反応が惹起され、ケモカインなどの過剰産生によって更に炎症細胞が病変部へリクルートされ炎症の慢性化が成立し、サイトカインや細胞傷害性T細胞などにより周辺の神経組織が破壊され変性を生じていると考えられている。

4. HAMの病態を把握する

バイオマーカー

上述のようにHAMの病態は、‘ウイルス感染症’と‘脊髄の慢性炎症’という2つの大きな側面を有しており、これらを把握して病態に則した治療を実践することが重要である。これらを把握するバイオマーカーとして、以下の項目が

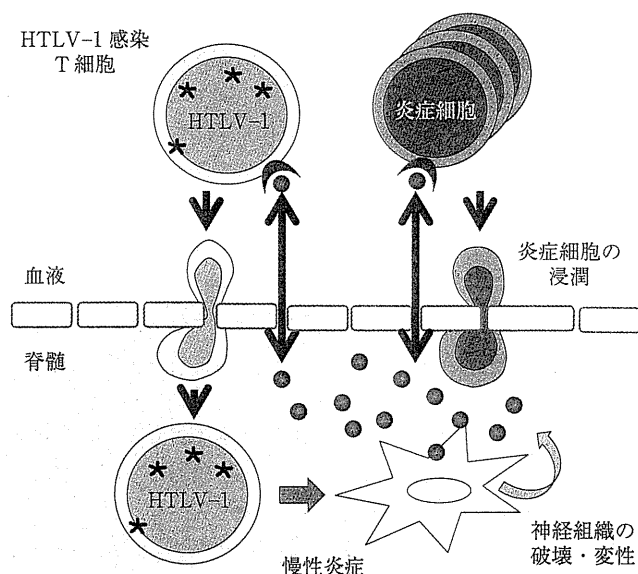


図3 HAMの病態

挙げられる。

1) ウイルス量

HAMのウイルス感染症としての側面を把握する方法として、ウイルス量の定量測定は患者におけるHTLV-1制御の程度を反映しており有用である。ウイルス量の測定は、エイズウイルスや肝炎ウイルスが血清中の濃度を測定するのとは異なり、HTLV-1はウイルス発現レベルが低く血清中には同定できないため、末梢血単核球細胞(PBMC)中に感染している割合をreal-time PCR法により測定する系が各研究室レベルで確立されている⁹⁾。しかし、HTLV-1ウイルス量の定量的測定を実施している施設は全国でも数少なく(HTLV-1情報サービスウェブサイト参照)、外注検査で測定することはできない。現在、厚生労働省研究班でHTLV-1ウイルス量測定法の標準化に向けた研究が実施されており、将来保険承認されることが期待される。なお、HAM患者でウイルス感染細胞数が増加している機構については解明されていないが、HTLV-1は生体内でのウイルス発現レベルが低く、またフリーな状態では極めて感染効率が悪いことが知られている。そのため、感染細胞数の増加は細胞間接着による感染拡大、あるいは

感染細胞の増殖によると考えられている。

2) 脊髄の慢性炎症のバイオマーカー

HAMにおける脊髄炎症の程度を把握するためには、髄液検査が必須である。一般的な髄液検査で測定できる項目では、細胞数、IgG濃度がHAM患者では高いことがある。しかし、これらの項目は時にHAMの炎症を把握するには感度が低く、実際は炎症があり症状が進行性であってもこれらの値は正常範囲内にとどまることがあるので注意が必要である。その意味で、保険承認はされていないが髄液中のネオプテリン濃度は外注検査可能(SRL)であり、より感度に優れている。

髄液検査は非常に優れているが、患者への侵襲もあり日常診療で実施することは必ずしも容易ではない。現在著者らは、関節リウマチ患者が関節炎の程度を採血(MMP-3濃度など)で把握できるように、HAM患者の血清中のバイオマーカー候補分子について研究を進めている。病気の程度や治療効果を採血で判定できるようになれば、患者の診療参加への意欲向上につながると期待される。

3) 疾患活動性を反映するバイオマーカー

このようにウイルス量や髄液所見など、HAM

患者で高い値を示すことが知られているマーカーは複数存在するが、これらの項目の中で、どの因子が疾患活動性を把握するうえでより有用であるかを比較検討した研究報告はない。そこで著者らは、治療介入のないHAM患者において多くのバイオマーカー候補分子を定量的に測定し、疾患活動性の高い群(過去5年間で症状が進行)と疾患活動性が低い群(過去5年間で症状の進行が停滞)で比較検討したところ、髄液の細胞数、ネオプテリン、特定のケモカイン濃度が、疾患活動性を有意に反映することを明らかにした(論文準備中)。また、予後との相関性に関する解析でも、髄液所見の重要性が明らかとなった。すなわち、HAM患者における脊髄炎症の程度は疾患活動性や予後と極めて強い相関があり、その把握は、HAMの治療方針決定や治療効果判定において重要であることが示されつつある。一方でウイルス量は、発症リスクや発病後の予後とある程度相関することが報告されているが⁹⁾、疾患活動性のマーカーとしてはそれほど有用ではない印象である。

HAMの治療の最終目標(エンドポイント)は、長期予後の改善である。しかし、このエンドポイントを対象に治験をデザインすることは非現実的であるため、最終エンドポイントと統計学的に相関し、かつ定量性の高い代替エンドポイントを設定する必要がある。髄液中の細胞数、ネオプテリン濃度、特定ケモカイン濃度、末梢血中ウイルス量などは、患者の長期予後と相関することが明らかとなったため、これらの項目の改善を代替エンドポイントとして必要症例数を統計学的に算出した、HAMの新しい標準的な治験プロトコルの作成が可能となってきた。

5. HAMの治療

1) HAMの治療にwindow of opportunityは存在するか

関節リウマチでは、発症2年以内を‘window of opportunity’(治療効果の最も高い時期)と呼んでおり、この時期を逃さずに治療導入をすることが関節リウマチ悪化を克服するのに最も重要であるといわれている。慢性炎症による神経

組織の破壊性疾患であるHAMも、発症早期に治療介入した方が治療の反応が良い可能性が高く、実際、インターフェロン α (IFN- α)の市販後調査の報告でも、その傾向が認められている⁷⁾。脊髄の神経組織はいったん変性してしまうとその再生治療は現時点では困難であるので、HAMも脊髄に不可逆的な組織破壊が起こる前に、すなわちできるだけ発症早期に疾患活動性を判定し、その程度に応じて治療介入の必要性を検討することが望ましいと考えられる。今後、HAMの臨床試験を実施する際には、罹病期間が治療効果に影響するかに関する解析も視野に入れてデザインすることが求められ、発症早期の治療介入が重要であることが明らかになれば、発病前のキャリアの時期から注意しておくことの重要性がより明確になる。

2) HAMの病態に則した治療戦略

上述したようにHAMの病態は、HTLV-1感染細胞に起因した脊髄での慢性炎症による神経組織障害とされている。よってその治療には①HTLV-1感染細胞の排除、②脊髄炎症の鎮静化、③神経細胞の再生、などが必要であるが、現時点では抗ウイルス療法や神経再生治療は研究開発段階であり、HAMの治療は炎症抑制効果をもつステロイドと、免疫調整・抗ウイルス作用をもつIFN- α によるものが主である。しかしながらこれらの治療薬ですら、適切な投与時期や投与量の参考になるような臨床試験のエビデンスに乏しいのが現状である。まずは、これまでに得られた主な知見を整理した(表1)。

a. ステロイドによる治療

HAMを対象としたステロイド治療の有効性に関する報告は古くからある⁸⁻¹¹⁾(表1)。規模の大きなものでは、HAM 131例を対象として1-2mg/kg連日or隔日投与で治療開始され1カ月投与後に6カ月かけて減量し、81.7%に有効、特に納(Osame)の運動障害重症度(表2)で1段階以上改善した症例が69.5%と、高い有効率が示されている¹¹⁾。この報告では、上述した急速進行型にメチルプレドニゾロン・パルス療法が10例中6例で有効であったという情報も記載されている¹¹⁾。一方で、外国からの報告ではメ

表1 HAMの主な治療報告のまとめ

年	国	報告者	試験 デザイン	薬 剤	投与量	観察期間	症例数	有効率	その他
1990	日本	Osame M, et al ⁹⁾	オープン	プレドニゾロン	60-80mg 隔日 2カ月 10mg/月で減量 4カ月 5mg 隔日 3カ月	9カ月	65	59/65 56.9% (1>) (著効13人)	副作用(13/65)
1990	英国	Duncan J, et al ⁹⁾	case series	メチルプレドニゾロン	500mg×5 days		9	6/9	効果は一過性
2008	ブラジル	Croda M, et al ¹⁰⁾	case series	メチルプレドニゾロン	1g×3 days/月を3-4カ月	2.2年	39	24.5% (2年後)	効果は一過性
1996	日本	Nakagawa M, et al ¹¹⁾	オープン	プレドニゾロン	1-2mg/kg 連日 or 隔日 を1-2カ月投与後減量	6-12カ月	131	81.7% 69.5% (1>)	髄液ネオプテリン減少
				メチルプレドニゾロン	500mg-1g×3 days		10	60%	急速進行型が対象
				インターフェロン α	3MU/day×30 days	1-3カ月	32	62.5% 21.9% (1>)	効果の持続なし 副作用(21/32)
1996	日本	Izumo S, et al ¹²⁾	多施設 二重盲検 無作為抽出	インターフェロン α	0.3MU/day×28 days	8週間	15	7.1%	副作用(4/15)
					1MU/day×28 days		17	23.5%	副作用(5/17)
					3MU/day×28 days		16	66.7%	副作用(8/16)
1997	日本	Yamasaki K, et al ¹³⁾	case series	インターフェロン α	6MU/day×14 days 後 6MU/3 times/wk×22 wk	6カ月	7	5/7	2例継続不能
2007	日本	Arimura K, et al ⁷⁾	Phase IV 市販後調査	インターフェロン α	3MU/day×4-793 (median 30) days	6カ月 (治療期間含)	167	66.2% 29.2% (1>)	副作用 87.4% 重篤副作用 7.0%
2006	英国 日本	Taylor GP, et al ¹⁴⁾	placebo 無作為抽出	zidobudine+ lamivudine	AZT 300mg+ 3TC 150mg 2回/day	48週間	16	臨床的改善なし	ウイルス量変化なし
2011	英国	Macchi B, et al ¹⁵⁾	case series	tenofovir	245mg/day	2-16カ月	6	臨床的改善なし	ウイルス量変化なし

(1>) : 納の運動障害重症度が1グレード以上改善.

MU: million unit, wk: week, AZT: zidobudine, 3TC: lamivudine.

表2 納の運動障害重症度

grade	状態
13	足の指も動かさない
12	寝返り不可能
11	自力では移動不能, 寝返り可
10	四つばい移動不能, いざり等移動可
9	両手によるつたい歩き不能, 四つばい移動可
8	両手によるつたい歩き5m以内可
7	両手によるつたい歩き5m以上, 10m以内可
6	片手によるつたい歩き不能: 両手なら10m以上可
5	片手によるつたい歩き
4	階段昇降に手すり必要
3	かけ足不能
2	歩行異常(つまずき, 膝のこわばり)
1	歩くスピードが遅い
0	歩行, 走行ともに異常認めない

チルプレドニゾロン・パルス療法の間欠的な投与は効果が一過性であったと報告されている^{9,10)}。問題は、いずれもオープン試験であり、プラセボを用いた多施設二重盲検無作為化比較試験が実施されていないため、その効果に関する信頼性に乏しいことである。またこれまでは、HAMの病型別に臨床試験がデザインされておらず、どのような症例にどれくらいの量をどれくらいの期間投与したらよいかなどに関するエビデンスが存在しない。ステロイドはHAMの治療薬として世界的に使用頻度が高いため、日常診療に役立つ情報を提供しうる臨床試験の実施が望まれている。

b. インターフェロンα治療

IFN-αは、その抗ウイルス作用と免疫調整作用を踏まえ、HAMへの応用が比較的早期から報告されている¹¹⁾。48例のHAM患者を対象とした、IFN-α: 30万、100万、300万単位の1日1回28日間連続投与の、多施設二重盲検無作為抽出法による3群比較の用量設定試験では、4週間の投与終了時点での有効率はそれぞれ7.1%、23.5%、66.7%で、300万単位群は有意差をもって機能障害の改善を示した¹²⁾。一方で、長期治療の効果に関しては、少数例を対象にした報告があるのみで¹³⁾、証明されていない。また、市販後調査の報告では、1カ月間投与した

その後の効果持続に関しては不明確であるとしており、副作用も87.4%に出現しているので注意深い観察を呼びかけている⁷⁾。このようにIFN-αは、HAMに対して唯一、多施設二重盲検無作為抽出法による臨床試験で効果が証明された薬剤であり、対象症例数が少ないもののエビデンスレベルは比較的高い。しかし、国際的なその治療効果に関する評価は決して高くないのが現状である。またIFN-αに関しても、病型別の患者を対象とした臨床試験は実施されておらず、治療対象となる患者、投与時期、投与期間などに関する情報が不足している。実際、急速進行性のHAM患者に対してはIFN-α治療では効果を示さず脱落したと報告されており^{7,13)}、ステロイド治療などとの使い分けに関する情報の整理が必要である。

6. HAMの治療法の確立に向けて

1) 臨床試験の実施体制の確立を

上述のように、HAMの治療に関するエビデンスは世界的にも絶対的に不足しており、様々なクリニカルクエスチョンに指針を示すことのできる治療ガイドラインを作成するには情報が不足しているのが現状である。したがって、希少疾患であるHAMの治療法を確立していくためには、治療ガイドライン作成に資する臨床試

験を実施しエビデンスを蓄積していく必要性が極めて高い。そのためには、薬効評価に必要な症例数を確保できるように全国的あるいは国際的な取り組み体制を構築し、薬事承認申請に必要なデータの収集が可能なプロトコールに則って治験を実施し、そのデータを客観的に解析できる体制が必要である。先進国でHAM患者が多いのは日本のみであるため、その体制づくりに課せられた我が国の責務は大きい。2011年に行われたHTLV-1国際会議において、このような状況に危機感を共有した世界中のHAM専門家がHAMの国際共同臨床試験グループ(HAM clinical trial study group: HAM CTSG)を結成し、臨床試験の実施に向け現在準備を進めている。

2) ウイルス量の制御とATL発病リスクを 意識

HAMの治療として免疫抑制作用薬による脊髄炎症の鎮静化が重要であることは明らかであるが、HAMはウイルス感染症であること、またATLという腫瘍性疾患の発症のリスクを抱えるという側面も有しており、免疫抑制作用薬による治療がそれらに及ぼす影響について留意する必要がある。免疫抑制の程度が異なるが、生体肝移植後にタクロリムスなどを使用していたキャリアからATLを発症した症例が報告されており¹⁶⁾、過度の免疫抑制には十分に注意する必要がある。ただし、通常ステロイド治療でウイルス量が増加することはない。また膠原病や関節リウマチなどの内科的疾患で免疫抑制療法を受けている患者にATLの発症が多いというエビデンスはなく、すなわちHAM患者やHTLV-1キャリアに対して内科的疾患レベルの免疫抑制治療を否定するエビデンスはないということも考慮し、慎重な対応が必要であろう。しかしながらこのような背景からも、ウイルス感染症およびATLの発症リスクを制御しながらHAMの抗炎症療法を実施できるようになることが、理想的な治療法であると考えられている。

HAMに対する抗ウイルス療法としては、逆転写酵素阻害剤を用いた臨床試験が報告されているが、zidovudineとlamivudineの併用に関する多施設無作為抽出臨床試験¹⁴⁾、tenofovirを用い

たパイロット試験¹⁵⁾などでは、ウイルス量の減少効果は全く得られていない。HTLV-1はエイズウイルスとは異なり、血清中でウイルスが存在せず転写レベルが低いという特徴を有しているので、ウイルス量の制御には異なった戦略が必要であると考えられる。またATL発症リスクの軽減という視点においては、ATLの治療で副作用の少ない治療法の応用も考慮される。最近、zidovudineとIFN- α の併用療法¹⁷⁾、抗CCR4抗体療法¹⁸⁾の有効性が報告されており、その後の結果に注目したい。

3) 分子標的治療法の開発

近年の免疫性疾患の治療において最も大きなインパクトを与えたものの一つに、関節リウマチの治療において炎症の鍵となっている一つの分子を標的とした治療によって、劇的な改善のみならず寛解をもたらすことが可能となった生物学的製剤の開発・導入が挙げられる。HAMに関しても、病態の主役を担っている分子の同定研究が進められている。希少疾患はその市場性から、これまでは製薬会社も開発に興味を示してこなかったが、他の希少難病治療薬の成功により、最近アンメットメディカルニーズの高い難治性疾患に対する開発が進められるようになってきた。今後は、研究者と製薬会社の協力と連携が進み、HAMの分子標的治療薬の開発とその治験の実施が加速することが望まれる。

おわりに

HAMが発見されてこの25年間、研究の進展により多くの病態が明らかとなり、治療薬も病態に応じて検討できるようになってきている。しかしながら、先進国で患者が多いのは日本のみであるという事情もあり、よくデザインされた臨床試験のエビデンスが絶対的に不足しており、治療法が確立されていないのが現状である。この現状を打破するためには、日常診療のクリニカルエクステンションに指針を示すことのできる治療ガイドライン作成が必要であり、そのためにはガイドライン作成に資する臨床試験の実施が急務であり、その実現に課せられた我が国の責務は大きい。また、脊髄の慢性炎症とウイル

ス感染症の制御が、当面のHAM治療の達成すべき課題であるが、損傷された脊髄の再生治療が成功して、初めて患者が満足できる治療を提供できるようになるであろう。‘普通に楽しく暮らせるようになりたい’という患者の願いが一日でも早く実現できるように、多くの研究者がその英知を結集してこの課題に取り組んでいただけることを願ってやまない。

■ 文 献

- 1) Osame M, et al: HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* **1**: 1031-1032, 1986.
- 2) Matsuoka E, et al: Perivascular T cells are infected with HTLV-I in the spinal cord lesions with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: Double staining of immunohistochemistry and polymerase chain reaction in situ hybridization. *Acta Neuropathol* **96**(4): 340-346, 1998.
- 3) Nagai M, et al: Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: High proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol* **4**(6): 586-593, 1998.
- 4) Matsuura E, et al: Neuroimmunity of HTLV-I Infection. *J Neuroimmune Pharmacol* **3**: 310-325, 2010.
- 5) Kamihira S, et al: Intra- and inter-laboratory variability in human T-cell leukemia virus type-1 proviral load quantification using real-time polymerase chain reaction assays: a multi-center study. *Cancer Sci* **101**(11): 2361-2367, 2010.
- 6) Matsuzaki T, et al: HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: Analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. *J Neurovirol* **7**(3): 228-234, 2001.
- 7) Arimura K, et al: Safety and efficacy of interferon- α in 167 patients with human T-cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy. *J Neurovirol* **13**: 364-372, 2007.
- 8) Osame M, et al: HTLV-I-associated myelopathy(HAM) Treatment trials. Retrospective survey and clinical and laboratory findings. *Hematol Rev* **3**: 271-284, 1990.
- 9) Duncan J, Rudge P: Methylprednisolone therapy in tropical spastic paraparesis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **53**: 173-174, 1990.
- 10) Croda M, et al: Corticosteroid therapy in TSP/HAM patients: the results from a 10 years open cohort. *J Neurol Sci* **269**: 133-137, 2008.
- 11) Nakagawa M, et al: Therapeutic trials in 200 patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol* **2**(5): 345-355, 1996.
- 12) Izumo S, et al: Interferon-alpha is effective in HTLV-I-associated myelopathy: A multicenter, randomized, double-blind, controlled trial. *Neurology* **46**: 1016-1021, 1996.
- 13) Yamasaki K, et al: Long term, high dose interferon-alpha treatment in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: a combined clinical, virological and immunological study. *J Neurol Sci* **147**: 135-144, 1997.
- 14) Taylor GP, et al: Zidovudine plus lamivudine in human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy: a randomized trial. *Retrovirology* **3**: 63-72, 2006.
- 15) Macchi B, et al: Susceptibility of primary HTLV-1 isolates from patients with HTLV-1-associated myelopathy to reverse transcriptase inhibitors. *Viruses* **3**: 469-483, 2011.
- 16) Kawano N, et al: Adult T-cell leukemia development from a human T-cell leukemia virus type I carrier after a living-donor liver transplantation. *Transplantation* **82**: 840-843, 2006.
- 17) Bazarbachi A, et al: Meta-analysis on the use of zidovudine and interferon-alfa in adult T-cell leukemia/lymphoma showing improved survival in the leukemic subtypes. *J Clin Oncol* **28**: 4177-4183, 2010.
- 18) Yamamoto K, et al: Phase I study of KW-0761, a defucosylated humanized anti-CCR4 antibody, in relapsed patients with adult T-cell leukemia-lymphoma and peripheral T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* **28**: 1591-1598, 2010.

高度医療評価制度下で実施する臨床試験の支援に関する研究 —がん領域における多施設共同試験の課題—

Clinical Trial Coordination under the Evaluation System of Investigational Medical Care in Japan : Operational Challenges in Multi-center Cancer Clinical Trials

青谷恵利子^{1,2)} 秦 友美¹⁾ 川上 温子¹⁾ 坪井 沙絵¹⁾
沼上 奈美¹⁾ 牛谷真由美¹⁾ 宮田かおる¹⁾ 野中 美和¹⁾
竹内 正弘¹⁾ 武林 亨²⁾ 藤原 恵一³⁾

ABSTRACT

The Evaluation System of Investigational Medical Care (ESIMeC) is a new clinical trial system that Ministry of Health, Labour and Welfare authorizes the coverage of medical expenses by Japanese health insurance system for the patients participating in the approved clinical trials with high quality control mechanism. This system became effective in 2008. The Kitasato University Clinical Trials Coordinating Center has supported two randomized, phase III trials being conducted under ESIMeC since 2009. One trial is to evaluate the efficacy and safety of intraperitoneal (IP) chemotherapy of Carboplatin for ovarian cancer patients; another trial is to evaluate the efficacy and safety of new anticancer agent Bevacizumab for recurrent ovarian cancer patients. Carboplatin is approved for ovarian cancer by intravenous administration, but not for IP administration. Bevacizumab is not approved for ovarian cancer. However, the indication-directed trial has been completed for the first line chemotherapy for ovarian cancer, but not for the recurrent setting.

In this article, we discuss the issues that need to be improved in the future, as well as the importance of the clinical trial coordinating center, so that ESIMeC will work better to accelerate investigator-initiated clinical trials evaluating new agents/medical techniques with no indication approval in Japan. Critical issues in cancer clinical trial coordination under ESIMeC include being familiar with the system itself, development of the clinical trial team, support of the application process for ESIMeC, establishment of serious adverse event reporting procedures, management of the study agents, and cost-effective study monitoring.

(Jpn Pharmacol Ther 2012; 40 suppl 1 : S67-79)

¹⁾北里大学臨床薬理研究所 臨床試験コーディネーティング部 ²⁾慶應義塾大学医学部 衛生学公衆衛生学教室 ³⁾埼玉医科大学国際医療センター 婦人科腫瘍科

Eriko Aotani : Clinical Trials Coordinating Center, Kitasato University Research Center for Clinical Pharmacology, and Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Medicine, Keio University ; Tomomi Hata, Atsuko Kawakami, Sae Tsuboi, Nami Numagami, Mayumi Ushitani, Kaoru Miyata, Miwa Nonaka, Masahiro Takeuchi : Clinical Trials Coordinating Center, Kitasato University Research Center for Clinical Pharmacology ; Toru Takebayashi : Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Medicine, Keio University ; Keiichi Fujiwara : Department of Gynecologic Oncology, Saitama Medical University International Medical Center

KEY WORDS Clinical Trail, Evaluation System of Investigational Medical Care (ESiMeC), Clinical Research Management

はじめに

平成 20 年に創設された高度医療評価制度は、薬事法上未承認・適応外の医薬品や医療機器の使用を伴う臨床試験を、先進医療の一類型として、保険診療と併用して実施することを可能とした。平成 23 年 12 月現在、35 種類の医療技術が高度医療（第 3 項先進医療）として実施が認められており、このうち 19 試験はがん関連である。制度の対象が未承認・適応外の医療技術であること、ならびに薬事法による申請等につながる科学的評価可能なデータ収集の迅速化を目的としていることから、高度医療を実施する医療機関と試験計画については、厚生労働省より発出された通知にいくつかの要件が定められている^{1,2)}。

本制度下で多施設共同のがん臨床試験を実施するには、通常の臨床試験に加えて、これらの要件を満たすことを目的とした特別な支援が必要と考えられるが、これまでに系統だった支援に関する報告は前例がない。そこで本論文では、われわれが取り組んだ 2 つの多施設共同がん臨床試験をもとに、重要と考えられた支援業務の内容を整理するとともに、今後の課題を明らかにしたい。

I 対象と方法

対象は、平成 21 年 1 月に開催された高度医療評価会議³⁾ならびに同年 4 月の先進医療専門家会議⁴⁾で審議・承認され、同年 4 月の中央社会保険医療協議会総会⁵⁾で保険給付との併用に問題なしと認められ、同年 5 月より実施可能となった 2 つの臨床試験 (iPocc 試験 [UMIN000003670]⁶⁾と GOG-0213 試験 [UMIN000003682]⁶⁾) である。これらの試験概要を図 1、2 に示すが、両試験とも多施設共同ランダム化第 III 相試験である。いずれも申請医療機関は埼玉医科大学国際医療センターであり、臨床試験コーディネーティングセンターを北里大学臨床薬理研究

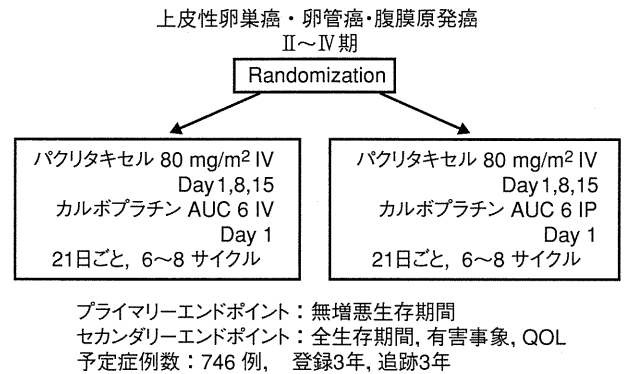


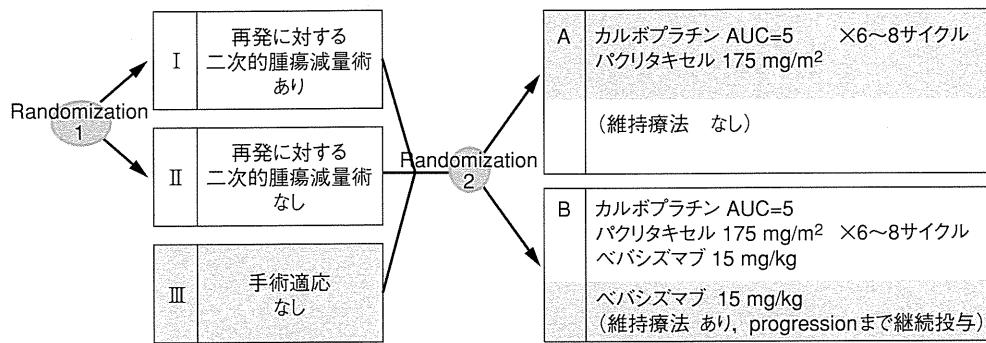
図 1 iPocc 試験の概要

iPocc 試験：上皮性卵巣癌・卵管癌・腹膜原発癌に対するパクリタキセル毎週点滴静注+カルボプラチン 3 週ごと点滴静注投与対パクリタキセル毎週点滴静注+カルボプラチン 3 週ごと腹腔内投与のランダム化第 II/III 相試験

所に置いた。平成 23 年 12 月現在、iPocc 試験では 25 医療機関、GOG-0213 試験では 12 医療機関が高度医療実施医療機関として承認されているが、さらなる症例登録促進を目指し、協力医療機関の申請を継続している。

iPocc 試験は、国内のがん臨床試験グループ (GOTIC : Gynecologic Oncology Trials and Investigation Consortium と JGOG : Japanese Gynecologic Oncology Group) 主導で実施され、国外の医療機関がこれに参加する臨床試験である。一方、GOG-0213 試験は、米国国立がん研究所の研究助成によって設置されている Gynecologic Oncology Group (GOG) が実施する臨床試験に、国内の医療機関が参加する臨床試験である。

本研究では、試験体制が異なる 2 つの臨床試験を支援した約 2.5 年間の支援内容を整理し、高度医療評価制度下で実施する大規模がん臨床試験において、特に留意すべき「新たなコーディネーション業務」を抽出した。



プライマリーエンドポイント：全生存期間
 セカンダリーエンドポイント：無増悪生存期間, QOL
 予定症例数：900例(日本では50例), 登録9年, 追跡1.5年

図 2 GOG-0213 試験の概要

GOG-0213 試験：プラチナ感受性の再発卵巣癌, 原発性腹膜癌または卵管癌の患者に対する
 ①二次的腫瘍減量手術の有効性, および②カルボプラチンとパクリタキセルの併用療法にペ
 バシズマブを併用維持療法として使用した場合の有効性を検討するランダム化第III相試験

II 結 果

1 事前相談における目的の明確化 (なぜ高度医療評価制度を用いるのか)

厚生労働省医政局研究開発振興課の高度医療担当官に事前相談する際は, 試験スケジュールに余裕のあるタイミングで申込みを行い, 「なぜ高度医療なのか」を薬事承認申請までのロードマップと併せて説明することが必要であった。われわれが最終的に厚生労働省に対して示したロードマップは以下のとおりである。

まず iPocc 試験では, 対象疾患に対するカルボプラチンの腹腔内投与は適応外であったことから, 当初はカルボプラチン腹腔内投与の薬事法上の承認(ならびに保険適用)につながる臨床試験の実施を目標と定めていた。しかし, パクリタキセルの毎週投与法も適応外であり, 医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議へ公知申請⁷⁾が妥当として関連学会より要望書を提出中であったため, パクリタキセルの用法/用量の変更を伴う臨床試験を, 併せて高度医療として実施することにより, 公知申請による薬事法上の承認(ならびに保険適用)につながる有効性と安全性のデータ蓄積を目指すこととした。

次に GOG-0213 試験では, 対象疾患(再発卵巣癌)に対するペバシズマブは適応外であった。しかし,

対象疾患に対するファーストライン治療としてのペバシズマブについては, すでに2つの国際共同試験が実施済みであった。そのうちの1つには日本からも9医療機関が参加し, 「国際共同医師主導治験」として実施した実績(当時は症例登録終了, 追跡期間中)があったため, GOG-0213 試験も医師主導治験として行うべきではないかという疑義照会があった。これに対する回答として, 高度医療担当官宛に研究代表者名で「本試験を医師主導治験では実施できない理由書」を作成して提出した。この理由書には, ①GOG-0213 試験は, 再発患者を対象に, ファーストライン治療として治験実施済みである同一の試験薬を使用する臨床試験であることから, 卵巣癌に対するファーストライン治療としてのペバシズマブが承認された場合は, GOG-0213 試験の結果と海外で実施中の別の試験の結果を併せて, ペバシズマブの国内販売企業が公知申請による薬事法上の承認取得を目指す可能性があること, ②日本単独で評価可能な症例数を確保することは難しいこと, ③高額なペバシズマブを患者負担や研究費で購入して試験を実施するのは困難であるため, 米国 NCI (National Cancer Institute) より試験薬が無償提供される本試験にタイムリーに参加して, 日本人データを集積することの意義を記載して, 高度医療評価制度下で GOG-0213 試験を実施することの妥当性を説明した。

2 試験実施体制

高度医療に係る要件には、臨床データの信頼性確保のために、①データマネジメント体制が確保されていること、②多施設共同研究として実施可能なモニタリング体制等が確保されていること、と明記されている¹⁾。これらの要件を満たす臨床試験実施体制を早期に確立し、具体的な役割分担を決めることが、試験準備期において最も重要なプロセスであった。限りある研究予算内で、効率良く長期的に継続可能な試験実施体制を確立することは、データ収集期間が長期に及ぶがん臨床試験ではきわめて重要である。われわれが構築した支援体制は次のとおりである。

iPocc 試験と GOG-0213 試験の試験実施体制を図 3, 4 に示す。iPocc 試験は、臨床試験グループの既存の組織を最大限に活用しつつ、試験実施体制を整備することが重要と考えた。一方、GOG-0213 試験では、原則として、米国 GOG にある機能は国内には重複して持たず、必要な資料を GOG から入手する方針とした。こちらも既存の GOG-Japan 組織を活用しつつ、国内の臨床試験を安全かつ効率的に実施するために必要となる機能を考慮して試験実施体制を決定した。また、必要に応じて、標準業務手順書やマニュアル等の作成や確認を行った。

3 高度医療に係る申請書等の作成支援

高度医療申請において、病院事務部門の協力は必須である。われわれは、医師が臨床試験に参加すべく努力して IRB 承認取得には至ったものの、高度医療申請のための院内調整ができず、試験準備が頓挫した医療機関の対応を複数経験した。たとえば、医療機関内の高度医療に関する相談窓口や手続きが明確でない、高度医療に係る費用の算出には薬価や医療材料費等の情報が必要だが事務部門の協力がまったく得られない、薬剤管理や CRC の協力を個人的に依頼しても話が進まない等が、その主な理由であった。また、表 1 に示すように、医療機関において申請準備が完了するまでには想像以上の時間を要したため、申請書類作成の煩雑さを理由に実施医療機関数が増えない状況を危惧し、コーディネーティングセンターは申請書類作成の全面支援を行った。

申請書作成に係る具体的な支援内容は、次のとおりであった。まず、「申請書作成見本」ならびに「高

度医療に係る費用見本（申請医療機関用として作成・承認された、保険外併用療養費の区分を説明した資料）」を作成して医療機関へ提供した。また、医療機関の事務担当者とメールや電話で直接やり取りを行い、申請書類の内容確認と校正を行った。その後、厚生労働省への内容確認の依頼代行、医療機関で押印された正本の副本（9 通）作成、厚生労働省への提出代行、高度医療評価会議の結果を速やかに医療機関へ連絡、医療機関での保管書類の確認等を実施した。

申請書類の作成時に最も多かった質問は、「費用の記載」ならびに「保険外併用療養費」に関するものであった。また、記載不備や不整合、金額の計算ミス等がしばしば散見された。申請書内の不整合のみならず、申請書と他の書類（IRB 申請書や GOG/NCI 登録内容）との間に不整合がないよう注意が必要であった。

ごく稀ではあるが、申請書の記載内容から、臨床研究に関する倫理指針⁸⁾に定められた IRB/倫理審査委員会に関する要件の不遵守（外部委員不在、女性の委員不在、医療機関の長が委員長を兼任、責任医師が審議に参加等）が発覚することがあり、当該医療機関には是正されるまですべての試験準備を停止し、早急に改善を求めた。同時に、研究グループに所属する全医療機関に対して、IRB/倫理審査委員会の要件について注意を喚起するアナウンスレターを発出した。

協力医療機関の担当者には、高度医療評価会議において協力医療機関の追加が承認され、先進医療専門家会議において当該医療機関が算出した保険外併用療養費の区分が承認された月の翌月 1 日付で地方厚生局より「先進医療の届出の受理について（通知）」が発行されるので、これに記載された「算定開始年月日」より試験の実施が可能となる旨を、コーディネーティングセンターからあらかじめ説明しておき、速やかに試験が開始できるようにその他の準備（試験薬搬入の準備等）を同時平行で進めてもらった。

また、申請内容の変更については厚生労働省への「変更の届出」が必要であるため、プロトコルや説明同意文書の改訂、IRB/倫理審査委員会の承認状況、実施者（医師）の追加/削除、事務担当者の変更等の

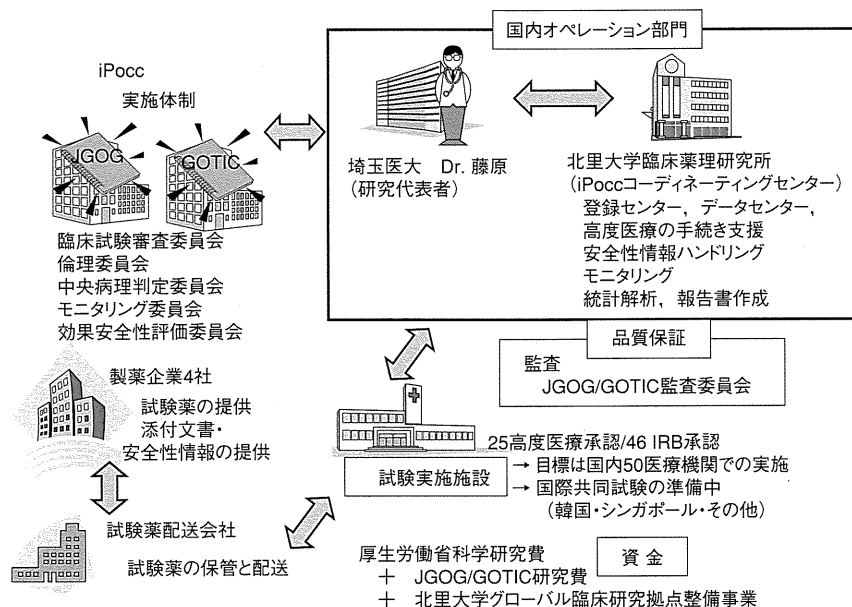


図 3 iPocc 試験実施体制

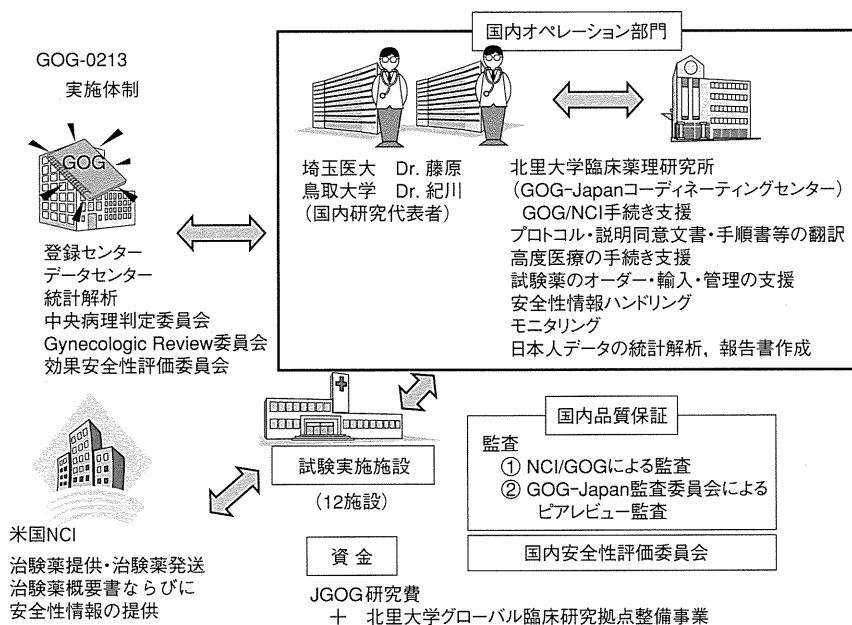


図 4 GOG-0213 試験実施体制