

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

分担研究者 森尾 友宏（東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野 准教授）  
研究協力者 清水 則夫（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・ウイルス治療学 准教授）  
今井 耕輔（東京医科歯科大学・大学院・小児・周産期地域医療学講座）  
中谷 夏織（東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野）

**研究要旨**

長期的免疫不全症、晚期合併症などが短期・長期予後を規定している。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た。

研究の中で、高感度多項目迅速微生物測定法を開発し、96 ウェルフォーマットの簡便な 12 ウイルス測定系を開発し、実際の移植後検体にて測定すると共に全自動化に向けての検証を行った。免疫学的再構築は sjKRECs, cjKRECs, TRECs 解析にて、B/T 細胞新生能を検討した。その結果免疫学的再構築に有利な条件が明らかになった。

**A. 研究目的**

造血細胞移植では、原疾患の再発に加えて、早期・晚期拒絶、混合キメラリズム、GVHD、感染症、長期的免疫不全症、晚期合併症などが短期・長期予後を規定している。骨髄内造血細胞移植などの新しい造血幹細胞移植技術においては、生命予後や移植関連合併症に加えて、その効果及び安全性を多角的にかつ科学的に検証することが重要である。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た。

**B. 研究方法**

1) 検体は東京医科歯科大学医学部附属病院において実施した造血細胞移植後患者の血液・尿などを用いた。

2) 高感度多項目迅速微生物測定法：12 ウイルス定性測定は LightCycler を用いて、melting curve

法にて解析した。リアルタイム PCR 同時測定系は 96 well フォーマットで実施した。さらに第二世代として両者を統合した半定量系（96 well）を開発して検証し、実際にサンプルを測定した。

また呼吸器関連ウイルスなどについては Parainfluenza virus, Metapneumovirus, RS virus などのモジュールを追加した。測定については検体調製から測定までの全自動系について検証を行った。

3) 免疫学的再構築評価法：signal joint T-cell receptor excision circles (sjTRECs), signal joint kappa deleting recombination excision circles (sjKRECs), coding joint KRECs (cjKRECs)をリアルタイム PCR 系で測定した。測定結果は $\square$ gDNA あたりのコピー数として表し、RNaseP および GAPDH をコントロールとして用いた。

## (倫理面への配慮)

検体採取に当たっては十分な説明の元に同意取得を行い、最小限の採血(1mL)にて検査を行った。本研究について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実施した。

## C. 研究結果

1. 高感度多項目迅速微生物測定法: 約 50 検体の測定から今までの capillary PCR: melting curve analysis 法とほぼ同程度の感度が得られることを確認した。また喀痰サンプルからのウイルス検査において実際に Parainfluenza 3 型などの検出が可能になり臨床に有用な情報を提供した。全自動化については引き続き検証を続けている。

2. 免疫学的再構築評価法: 117 名の検体にて移植後 1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月、24 ヶ月時点での解析を行い、移植後感染症(細菌、真菌、ウイルス)、生存との相関について解析した。その結果、単変量解析においては TRECs, KRECs が移植後感染症や生存率と相関することが明らかになりつつある。また TRECs, KRECs の回復に寄与する因子についても解析を加えた。その結果臍帯血移植が KRECs 回復に有利であることや、免疫学的再構築にはレシピエント年齢が関与することなどが明らかになった。

### 3. 全自動化

これらのシステム(核酸抽出 解析・データアウトプット)の全自動化につき既存の機器あるいは開発中の機器にて検討を行った。現時点ではその評価中である。

## D. 考察

移植後の定量的なモニタリングシステムの開発は新規移植技術評価において極めて重要である。微生物モニタリングシステムは既にいくつかの方法が開発されており、今後は multiplex 化、低価格化、全自動化が課題と考えている。免疫学的再構築評価法

については KRECs, TRECs が移植後の感染症や予後を見するものとなることを期待している。実際には移植後 1 年後のデータとその後の感染症、合併症の関連なども重要な課題であり、今後症例を蓄積していく必要がある。またこの測定系については、全自動化に載せることにより、さらに簡便かつ低価格に解析ができるようになると思われる。

## E. 結論

造血細胞移植後の感染症、免疫学的再構築について短時間に、簡便に、かつ安価に行える方法を開発し、検証した。今後本研究の臨床研究が進めば、モニタリングとして有用なものが構築できたと考えている。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1). Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsui N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammerstrom Q, van Zelm M.C., Morio T, Imai K, Nonoyama S. Classification of common variable immunodeficiency by quantification of T cell receptor and Ig kappa-deleting recombination excision circles. *J. Allerg. Clin. Immunol.* 49:01839-8, 2012.
- 2). Uchida Y, Matsubara K, Morio T, Kasawaki Y, Iwata A, Yura K, Kamimura K, Nigami H, Fukawya T. Acute cerebellitis and concurrent encephalitis associated with parvovirus B19 infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 31:427, 2012.
- 3). Morio T, Atsuta Y, Tomizawa D, Nagamura-Inoue T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara T, Kato S. Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88 patients

with primary immunodeficiency in Japan. *Br. J. Haematol.* 154:363-372, 2011

- 4). Miyanaga M, Sugita S, Shimizu N, Morio T, Miyata K, Mochizuki M. A significant association of viral loads with corneal endothelial cell damage in cytomegalovirus anterior uveitis. *Br J Ophthalmol.* 94: 334-340, 2010.
- 5). 森尾友宏 : ( 分担執筆 ) 多項目ウイルスモニタリングからの情報[診療のコツ]、豊嶋崇徳編、症例とエビデンスに学ぶ 造血細胞移植と感染症、p150-2、医薬ジャーナル社、大阪、2011年8月15日

## 2. 学会発表

- 1). Morio T, Tomizawa D, Atsuta Y, Nagamura T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara S, and Kato S. Unrelated umbilical cord blood transplantation for patients with primary immunodeficiency in Japan. The 52nd ASH Annual Meeting. Orlando, Florida, USA. December 2010.
- 2). Morio T, Tomizawa D, Atsuta Y, Nagamura T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara S, and Kato S. Unrelated umbilical cord blood transplantation for patients with primary immunodeficiency in Japan. XIVth meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Istanbul, Republic of Turkey. October 2010.
- 3). Morio T. 臍帯血移植における免疫モニタリングと T 細胞免疫療法 Immunomonitoring and T-cell immunotherapy in CBT. 第 2 回 韓国 - 日本臍帯血移植シンポジウム The Second Korea-Japan Cord Blood Transplantation Symposium. Yokohama, Japan. September 2010.
- 4). 森尾友宏 : 再生医療・細胞治療領域で問題となる微生物のモニタリング、第 60 回日本ウイル

ス学会学術集会 (シンポジウム) 大阪、2012年11月13日-11月15日

- 5). 森尾友宏 : 「医療機関における自家細胞・組織を用いた再生・細胞医療の実施について」: 免疫細胞療法における指針及び治療の現状と展望、第 60 回日本輸血細胞治療学会(シンポジウム)、福島、2012年5月27日
- 6). 森尾友宏 : 原発性免疫不全症候群に対する造血幹細胞移植療法、第 3 回移植後キメリズム解析研究会、東京、2012年2月2日
- 7). 森尾友宏 : ウイルス特異的 T 細胞とその維持、第 18 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム、埼玉、2011年10月21日
- 8). 森尾友宏、寺田尚美、大川哲平、遠藤明史、小野敏明、富澤大輔、高木正稔、長澤正之、大山敦、峯岸志津子、新井文子、中川紀子、今井耕輔、野々山恵章、水谷修紀 : 造血細胞移植後の B・T 細胞新生と機能の評価 Evaluation of B/T cell neogenesis and T cell function following hematopoietic cell transplantation、第 33 回日本造血細胞移植学会、愛媛、2011年3月10日
- 9). 森尾友宏 : 造血細胞移植後のウイルスモニタリングと感染制御、第 11 回血液細胞療法フォーラム、大阪、2010年10月16日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

