

201229010B

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

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

(H22-免疫-一般-010)

平成22年度～24年度 総合研究報告書

平成25 (2013) 年5月

研究代表者 藤 堂 省

(北海道大学 大学院医学研究科・移植外科学講座・教授)

目次

I. 総合研究報告

「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	5
----------------------------------------------	---

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

該当なし

III. 研究成果の刊行物・別刷

該当なし

I. 総合研究報告

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）
総合研究報告書

「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
（平成22～24年度）

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

研究要旨：肝移植は末期肝不全患者に対する治療法として普及してきたが、拒絶反応制御の為に免疫抑制剤を終生服用しなければならず、免疫抑制剤を中止しても正常なグラフト機能を維持できる免疫寛容の誘導が必要である。共同研究者奥村らは、抗CD80および抗CD86抗体を用いドナー抗原特異的な制御性T細胞の誘導法を独自に開発し、サル腎移植モデルにおいて免疫寛容の誘導に成功している。また、共同研究者寺岡らは、奥村らの方法を応用し、腎移植患者で免疫抑制剤の減量に成功している。肝臓は他の臓器と比べ免疫寛容が誘導され易い移植臓器の1つである。本研究は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を臨床応用し、より安全で確実な免疫寛容誘導法の確立が目的である。本年度末までに、生体肝移植患者10例において本治療法を施行した。症例3まではPBMCを用い、抗CD80および抗CD86抗体存在下に制御性T細胞を誘導した。症例4以降ではこれにレシピエント脾細胞を加え細胞量増加を図った。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、特にCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T細胞は培養開始時に比べ2.7から8.8倍上昇した。また、レシピエントPBMCに培養細胞を添加することで*in vitro*においてドナー抗原に対するMLRは抑制された。肝移植後はステロイド・MMF・カルシニューリン阻害剤（CNI）の3剤で免疫抑制を開始し、術後13日目に培養細胞を輸注した。全症例で培養細胞輸注に伴う副作用は認められなかった。本臨床試験10症例中、8症例で免疫抑制剤の減量に成功した。残り2症例は薬剤減量中に拒絶反応を来したが、その反応は軽微であり、免疫抑制剤増量により肝機能は正常化した。免疫抑制剤の減量に成功した症例のうち4症例は免疫抑制剤から完全に離脱し、現時点において既に4～8ヶ月間、免疫抑制剤フリーで経過しており、免疫寛容誘導が期待される。今後もこれら臨床試験症例の経過をフォローすることが重要であり、症例数を増やすべく多施設との共同試験を実施する必要がある。

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. 目的

肝臓移植は末期肝不全患者に対する究極の治療法として広く普及してきた。年間に海外では2万例以上、我が国でも500例以上の症例を数える。しかし、これら患者は拒絶反応制御の為、免疫抑制剤を生体服用しなければならず、感染症・発癌・薬剤による副作用等の危険性に常に晒され、医学的にも又、医療経済の上からも重要な問題である。従って、これらの問題を払拭するためには、免疫抑制剤を中止してもグラフトが正常に機能する、いわゆる免疫寛容の誘導が必須である。

本研究は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. 研究対象と方法

1. 対象患者（レシピエント）とそのドナー

(1) 患者（レシピエント）

北海道大学病院第一外科に入院中の末期肝不全患者を対象とし、以下の選択基準をすべて満たし、かつ除外基準のいずれにも該当しない場合を適格とする。

(a) 選択基準

- ①北海道大学病院第一外科および専門医師集団（内科・放射線科・麻酔科・精神科・病理など）で生体肝移植の適応と認められた患者。
- ②北海道大学大学院医学研究科「医の倫理委員会」で、生体肝移植の実施に関して承認を受けた患者。
- ③同意取得時において、年齢が20歳以上の成人患者。
- ④研究の参加にあたり、研究に関して十分な説明を受けた後、研究内容を

十分理解の上で、本人の自由意志により文書で同意が得られた患者。

(b) 除外基準

- ①研究に参加にあたり、十分な判断力がないまたは意識がない患者。
- ②その他、医学的理由等により、研究責任者または研究分担者（以下、研究担当者）が不適切と判断した患者

(2) ドナー

以下の選択基準をすべて満たし、かつ除外基準のいずれにも該当しない場合を適格とする。

(a) 選択基準

- ①レシピエントの2親等または配偶者
- ②心身ともに健康で、自発的な臓器提供意思がはっきりしている者
- ③同意取得時において、年齢が20歳以上の成人。
- ④血液型が、患者と一致ないし適合した者。
- ⑤北海道大学病院第一外科および専門医師集団（内科・放射線科・麻酔科・精神科・病理など）で生体肝移植のドナーとして適切であると認められたドナー。
- ⑥北海道大学大学院医学研究科「医の倫理委員会」で、生体肝移植の実施に関して承認を受けたドナー。
- ⑦研究の参加にあたり、研究に関して十分な説明を受けた後、研究内容を十分理解の上で、本人の自由意志により文書で同意が得られたドナー。

(b) 除外基準

- ①研究に参加にあたり、十分な判断力がないドナー。
- ②その他、医学的理由等により、研究担当者が不適切と判断したドナー。

2. 研究の方法

(1) 研究の種類・デザイン

非対照、非盲検による探索的臨床試験（第2相臨床試験）

(2) 試験のアウトライン (図1)

患者およびドナーリンパ球を所定量で採取し、抗CD80抗体、抗CD86抗体存在下で14日間培養し、制御性T細胞を誘導・増殖させ、患者に投与する。免疫抑制療法を規定に従って行い、免疫寛容状態が得られたかを評価する。

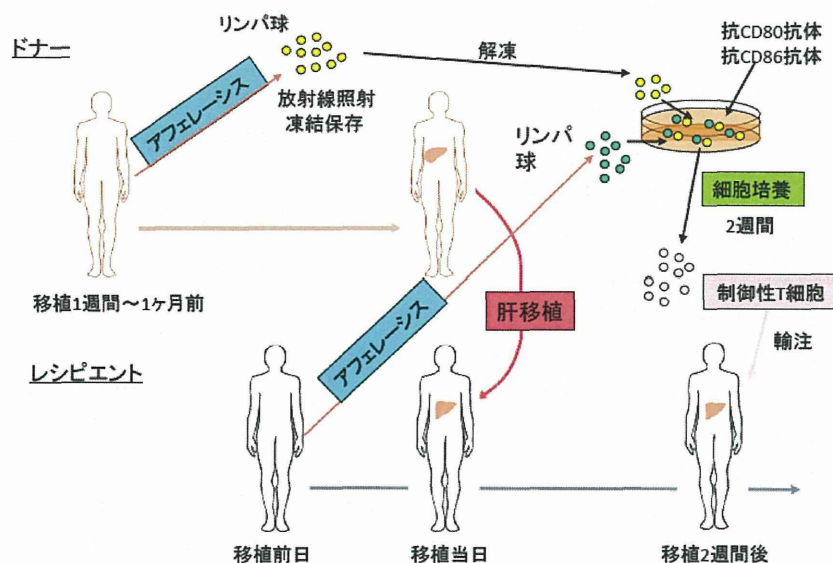
「試験物標準書」に従って実施する。ここでは概要を示す。

(a) ドナーリンパ球の採取

採取は、日本造血細胞移植学会および日本輸血・細胞治療学会のガイドラインを遵守し、院内の「造血細胞採取標準作業手順書」の規定に従って、以

図1. 肝移植臨床試験におけるプロトコール

対象: 成人間生体肝移植症例

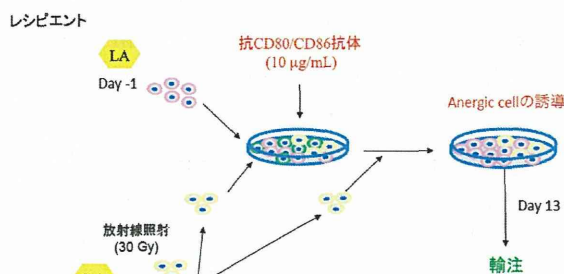


(3) 患者およびドナーの適格性の判定

「1. 対象患者、ドナーおよび適格性の基準」に従って、患者およびドナーの適格性を判定する。

(4) 制御性T細胞の誘導方法(図2)

図2. 制御性T細胞のex-vivo誘導プロトコール



試験物の調製方法は、別に規定する

下の手順で実施する。採取担当者は、検査・輸血部（または高度先進医療支援センター、造血細胞治療センター）の医師とし、本研究の研究担当者はその指示に従うものとする。

- ①手術5日前までに、成分採血装置（COBE Spectra）を用いて、検査・輸血部内の自己血採血室にてリンパ球を採取する。
- ②採取はMNCモードとし、採取量はドナー体重換算 150 ml/kgを目安とし、採取時間は120分以内とする。ただし、ドナーの状態により、採取担当者の判断で150分を上限にして延長できる。
- ③採取中はドナーの状態に注意し、血管迷走神経反射等の出現により採取の継続が困難となった場合は、採取

担当者の判断で採取を中止する。

- ④採取目標値は、白血球数で 4×10^9 以上とする。目標値に到達しなかった場合は、翌日、同一ドナーから再度、成分採血装置を用いて採取を行う。
- ⑤採取した細胞は、採取担当者から本研究の研究担当者へ引き渡す。

(b) ドナーリンパ球の凍結保存

凍結保存は、院内の「末梢血単核球凍結保存標準作業手順書」の規定に従って、以下の手順で実施する。以下の工程のうち、③④は高度先進医療支援センター細胞プロセッシングルーム無菌培養室（以下、無菌培養室）で行う。

- ①凍結保存前に、検査・輸血部内の照射装置により、採取細胞に30Gyの放射線照射を行う。
- ②採取細胞から検体を採取し、白血球数および生細胞率の測定を行う。
- ③凍結保存は規定された方法で実施する。細胞は、 2×10^9 以上で2つの凍結バッグに分けて保存する。
- ④凍害保護液はCP-1（極東製薬）を用い、DMSO 5%、HES 6%の凍結条件とする。CP-1は医薬品ではないが、造血細胞移植の際には、広く日本国内で使用されている。
- ⑤凍害保護液を加えた細胞は、 -80°C の冷凍庫に静置して凍結し、そのまま使用時まで高度先進医療支援センター細胞プロセッシングルーム細胞保存室（以下、細胞保存室）内の -80°C の冷凍庫に保管する。
- ⑥凍結保存細胞の一部を採取し、無菌検査を実施する。

(c) 患者リンパ球の採取

採取は、日本造血細胞移植学会・日本輸血学会のガイドラインを遵守し、院内の「造血細胞採取標準作業手順書」の規定に従って、以下の手順で実施する。採取担当者は、検査・輸血部（または高度先進医療支援センター、造血

細胞治療センター）の医師とし、本研究の研究担当者はその指示に従うものとする。

- ①手術前日に、成分採血装置（COBE Spectra）を用いて、検査・輸血部内の自己血採血室にてリンパ球を採取する。
- ②採取はMNCモードとし、採取量は患者体重換算 200ml/kgを目安とし、採取時間は150分以内とする。ただし、患者の状態により、採取担当者の判断で180分を上限にして延長できる。
- ③採取中は患者の状態に注意し、血管迷走神経反射等の出現により採取の継続が困難となった場合は、採取担当者の判断で採取を中止する。
- ④採取した細胞は、採取担当者から本研究の研究担当者へ引き渡す。
- ⑤採取細胞から検体を採取し、白血球数および生細胞率の測定を行う。また、検体の一部を用い、細胞免疫学的検査を行う。
- ⑥採取目標値は、白血球数で 5×10^9 以上とする。採取細胞数が目標値に到達しないことに対する対応は以下の通りとする。

<採取細胞数の不足への対応>

- i) 患者リンパ球の事前採取と保存
患者の末梢血リンパ球数が少ないなどの理由から、1回の採取で目標細胞数に達しないことが予想される場合は、手術5日前までに事前採取を行う。この場合、手順は（c）患者リンパ球の採取の方法に準じて行い、採取した細胞は（b）ドナーリンパ球の凍結保存の方法に準じて凍結保存する。
- ii) 脾臓リンパ球の採取
事前採取した細胞と手術前日に採取した細胞の合計は目標値に到達していない場合は、手術時に患者から脾臓を摘出し、そのリンパ球を加える。
脾臓のリンパ球を使用する場合は、

以下の手順で実施する。作業は、高度先進医療支援センター細胞プロセッシングルーム細胞処理解析室で行う。

- ①対象患者より肝移植術中に脾臓を摘出し、細胞処理解析室に搬入する。
- ②摘出脾臓を細切し、Hanks培養液内に浮遊した細胞を回収する。
- ③浮遊細胞をnylon meshに通しsingle cell suspensionとする。
- ④トリス塩化アンモニウム溶液により赤血球を溶解した後、Hanks液で3回洗浄する。
- ⑤細胞の一部を用いて、無菌検査を実施する。

(d) リンパ球培養（制御性T細胞の誘導と増殖）

以下の作業は、高度先進医療支援センター細胞プロセッシングルーム無菌培養室で行う（ただし、②⑤⑭の作業は無菌培養室外の細胞プロセッシングルーム内で行う）。

- ①患者の採取細胞から、比重遠心法にてリンパ球（単核細胞）を分離する。その際、血漿60mlを分取する。
- ②分取した血漿を、56℃にて30分間加温し、非動化する。
- ③①で分離した細胞をPBSで2回洗浄する。
- ④洗浄後、培養バッグにALyS505N液500mlを用いて浮遊させ、更に非動化した患者血漿50ml、抗CD80抗体（2D10.4）15 mg、抗CD86抗体（IT2.2）15 mgを加える。
- ⑤凍結保存されたドナー細胞（1バッグ、 2×10^9 相当）を、37℃恒温槽で解凍する。
- ⑥解凍したドナー細胞から、比重遠心法にてリンパ球（単核細胞）を分離する。
- ⑦⑥で分離した細胞をPBSで2回洗浄する。
- ⑧洗浄後、培養バッグにALyS505N液500mlを用いて浮遊させ、④の培養

バッグに加える。

- ⑨1週間、37℃インキュベーターで培養する。

<1週間後>

- ⑩培養バッグから細胞液を回収し、遠心する。培養液を除去後、細胞を50 mlのALyS505N液に再浮遊する。
 - ⑪再浮遊した細胞から、比重遠心法にてリンパ球（単核細胞）を分離する。
 - ⑫⑩で分離した細胞をPBSで2回洗浄する。
 - ⑬洗浄後、培養バッグにALyS505N液500 mlを用いて浮遊させ、更に非動化した患者血漿10 ml、抗CD80抗体（2D10.4）10 mg、抗CD86抗体（IT2.2）10 mgを加える。
 - ⑭凍結保存されたドナー細胞（1バッグ、 2×10^9 相当）を、37℃恒温槽で解凍する。
 - ⑮解凍したドナー細胞から、比重遠心法にてリンパ球（単核細胞）を分離する。
 - ⑯⑮で分離した細胞をPBSで2回洗浄する。
 - ⑰洗浄後、培養バッグにALyS505N液500 mlを用い浮遊させ、⑬の培養バッグに加える。
 - ⑱1週間、37℃インキュベーターで培養する。
 - ⑲培養3日目に培養液の一部を採取する（別途、微生物検査を実施）。
- (e) 培養リンパ球の輸注
- 以下の作業は、高度先進医療支援センター細胞プロセッシングルーム無菌培養室で行う（ただし、⑤は患者病室内で行う）
- ①培養バッグから細胞を回収、遠心、PBSにて洗浄した後、細胞を50 mlのALyS505N液に浮遊する。
 - ②培養液の一部を採取する（別途、微生物検査およびエンドトキシン検査を実施）。
 - ③細胞浮遊液から比重遠心法にて、リ

ンパ球（単核細胞）を分離し、ALyS505N液で洗浄する。細胞回収後、さらに生理食塩水で4回洗浄する。

- ④細胞を100 mlの生理食塩水に浮遊し、検査用検体を採取する（別途、細胞数の検査を実施）。
- ⑤輸血用フィルターを通して患者に静脈内投与する。投与に際しては患者のバイタルサインに注意する。予期不能な血圧低下などの症状が出現したら直ちに投与を中止する。

(5) 制御性T細胞の品質基準

調製した細胞について、以下の品質試験を実施し、被験者への投与を行う。

対象物	試験項目	試験方法	判定基準
中間試験物	無菌検査	一般細菌、真菌培養	菌が検出されないこと
	エンドトキシン検査	比濁分析法	感度以下
	マイコプラズマ	培養法	検出されないこと
最終試験物	細胞数検査	血球計測装置	1×10^8 個以上
	細菌検査	一般細菌、真菌培養	菌が検出されないこと
	エンドトキシン検査	比色法	感度以下
	マイコプラズマ	培養法	陰性

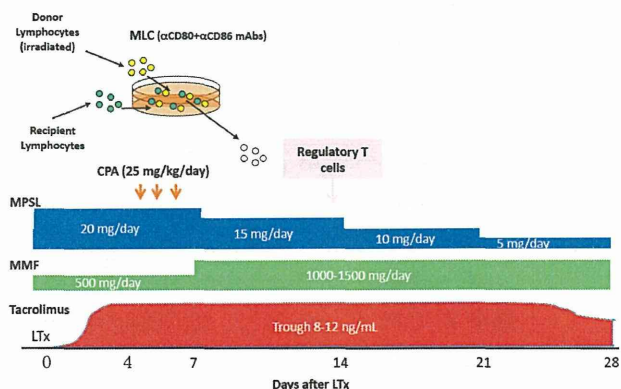
(6) 生体肝移植の実施方法

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。

(7) 免疫抑制療法

本研究での免疫抑制療法（制御性T細胞を用いた免疫抑制療法）（図3）

図3. 制御性T細胞治療による免疫寛容誘導プロトコール



北海道大学病院第一外科ではこれまでに200例以上に生体肝移植を行い、これらの症例に用いられた標準的免疫抑制剤は以下の通りである。

- ①プログラフ：移植術後3日目から投与（1日2回）開始し、血中トラフ濃度8-12 ng/mlを維持する。全身状態や肝機能検査、拒絶反応の有無などにより血中トラフ濃度を5-7 ng/mlまで漸減した後は、これを維持する。
- ②セルセプト：移植手術翌日から500 mg/dayを内服開始し、1週間後に1000 mg/dayへ増量する。必要に応じて2000 mg/dayまで増量する場合がある。
- ③ステロイド：再灌流時-1000 mg, 術翌日からは20 mg/dayを1週間投与する。基本的には1週間毎に5 mg/dayずつ減量する。
- ④シムレクト（抗CD25抗体）：移植手術終了時および術後4日目に、一回20 mgを静脈内投与する。

上記の標準的免疫抑制療法に加え、以下の治療を行う。ただし、シムレクト(抗 CD25 抗体)：は制御性 T 細胞に対する影響が不明瞭あるため、使用しない。サイクロフォスファミドは、制御性 T 細胞を輸注する前に、レシピエントのリンパ球を減少させる目的で使用する。

- ①サイクロフォスファミド：術後 4 日目から 25 mg/kg/day を 2 日間
- ②培養リンパ球(制御性 T 細胞)：術後 13 日目に誘導細胞を輸注

(8) 免疫抑制剤からの離脱

定期的に血液生化学検査や免疫学的検査および必要に応じて肝生検を行い、グラフト機能、拒絶反応の有無や免疫状態を注意深くモニタリングし、免疫抑制剤(コルチコステロイド>ミコフェーノール・モフェチール>タクロリムス)を段階的に減量する。

免疫抑制剤の減量は以下の通りとする。

(a) ステロイド

現行の標準的免疫抑制プロトコールに従い、20 mg/day の初期量から 1 週間ごとに 5 mg/day を減量し、術後 5 週目に中止する。

(b) セルセプト

現行の標準的免疫抑制プロトコールに従い、500 mg/day の初期量から 1 週間に 1000 mg/day、2 週間目に 1500 mg/day まで増量する。術後 5 週目から 500 mg/day を 1 ヶ月ごとに減量し、術後 4 ヶ月目に中止する。

(c) タクロリムス

術後 6 ヶ月間は、2 分割/日投与による血中トラフ濃度を 8-12 ng/ml で維持し、その後は半量に漸減する。その後は、ピッツバーグ大学の漸減スケジュールを遵守して行う⁹⁾。

- ①1 日一回 (2-3 ヶ月間)
- ②1 日おき (2-3 ヶ月間)

③週 3 回 (2-3 ヶ月間)

④週 2 回 (2-3 ヶ月間)

⑤週 1 回 (2-3 ヶ月間)

⑥投与中止

(9) 拒絶反応の診断と治療

(a) 拒絶反応の診断

①身体所見

発熱・全身倦怠などの出現に注意を払う。

②血液/生化学的検査

T-Bil/AST/ALT/ γ -GTP などのいずれかが基準値の 2 倍以上に上昇した場合、拒絶反応を疑い、直ちに肝生検を行い、迅速診断で確認する。その後永久標本で確認する。免疫組織染色、浸潤細胞の解析用に凍結切片を保存しておく。

③生検肝の病理学的診断

Glisson 鞘の細胞浸潤、胆管上皮細胞異形、細胆管壁内リンパ球浸潤、中心静脈炎などの所見により拒絶反応の組織診断を行う。特に免疫抑制療法中止後は、肝機能検査が正常でも肝繊維化や慢性拒絶の存在があり得るので¹⁰⁾、免疫抑制剤中止直前、中止後 1 年以内は 3 ヶ月毎、2 年目は 6 ヶ月毎、その後は 1 年毎に肝生検を定期的に行う。

(b) 拒絶反応の治療

①細胞性拒絶反応

ステロイドパルス療法を行い、これに不応性の場合は OKT3 モノクローナル抗体を静脈内投与する。ステロイドパルス療法は、ソルメドロール 200mg の静脈内投与し、その後 40 mg/day で漸減・減量する。

②液性拒絶反応

ステロイドパルス療法を行い、その後直ちに血漿交換を行う。必要に応じてリツキシマブ 375 mg/m²、OKT3 モノクローナル抗体を静脈内投与する。

③拒絶反応後の治療

上記の方法により拒絶反応と診断・治療された場合には、本プロトコール

からによる免疫寛容導入療法は中止となり、従来の免疫抑制療法へと移行する。すなわち、カルシニューリンインヒビター、代謝拮抗薬、ステロイドによる免疫抑制療法が再開とする。

(10) 免疫学的モニタリング

(a) 制御性 T 細胞の免疫学的検討
(*in vitro*)

*Ex vivo*にて誘導した制御性 T 細胞 (CD4⁺CD25⁺) を輸注直前に MACS を用いて *negative selection* し、放射線照射 (30 Gy) したドナーおよびレシピエントリンパ球と共に 5-7 日間混合培養し、リンパ球増殖の抑制反応をチミジン取り込み法で検討する。なお、誘導した制御性 T 細胞はマイクロアレイ・プロテオミクス解析のため凍結保存する。

(b) レシピエントの免疫学的モニタリング

(i) 末梢血リンパ球：移植後 0, 3, 7, 10, 14, 21, 28 日および以降は月に 1-2 回、以下の項目につき検討を行う。採血量は 1 回あたり 10-20 ml とする。

- ① Immuknow (cylex)
- ② MLR: (レシピエント vs ドナー・third party)
- ③ ELISPOT (IFN- γ): (レシピエント vs ドナー・third party)
- ④ Flow cytometryによる phenotype 解析 (CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺, CD4⁺CD154⁺, $\gamma\delta$ -T cell, DC-1/2 など)
- ⑤ Trans-vivo DTH
- ⑥ リンパ球クロスマッチおよび抗ドナー抗体 (Flow-PRA)

(ii) グラフト肝組織：肝生検時に以下の項目につき検討を行う。なお、生検肝組織はマイクロアレイ・プロテオミクス解析¹¹⁾のため凍結保存する。

① 免疫化学組織染色 (CD4, CD8, Foxp3 など)

② PCRによる mRNA 解析 (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TGF- β , Foxp3 など)

(11) 主要評価項目 (エンドポイント)

- ① 移植1年後のタクロリムス、ステロイド、セルセプトの減少率 (historical controlとの比較)
- ② 移植2、3、4、5年後のタクロリムス、ステロイド、セルセプトの減少率 (historical controlとの比較)
- ③ 移植後の免疫抑制剤の5年後の終了割合、終了した場合はその時期
- ④ 培養後細胞の制御性T細胞を含めた免疫学的特性
- ⑤ 培養制御性T細胞治療の安全性 (有害事象の頻度と程度)
- ⑥ *in vitro*における免疫抑制効果

(12) 被験者の人権に対する配慮および個人情報の保護の方法

本研究のすべての担当者は、「ヘルシンキ宣言 (2008年10月修正)」および「臨床研究に関する倫理指針 (平成20年7月31日改正、以下臨床研究倫理指針)」を遵守して実施する。

研究実施に係る試料等を取扱う際は、被験者の個人情報とは無関係の番号を付して管理し、被験者の秘密保護に十分配慮する。研究の結果を公表する際は、被験者を特定できる情報を含まないようにする。また、研究の目的以外に、研究で得られた被験者の試料等を使用しない。

本研究実施に係わる生データ類および同意書等を扱う際には、患者の秘密保護に十分配慮し、個人情報は外部には公開しない。患者に関する個人情報と個人識別情報はパスワードを設定して別々に保管管理する。解析されたデ

ータは匿名化を行い、個人情報特定されないように配慮する。

研究結果の学術的発表に際しては、個人を特定できる情報は公表しない。

(13) 同意取得方法

研究担当者は、審査委員会で承認の得られた同意説明文書を被験者に渡し、文書および口頭による十分な説明を行い、被験者の自由意思による同意を文書で取得する。

研究担当者は、被験者の同意に影響を及ぼす情報が得られたときや、被験者の同意に影響を及ぼすような実施計画等の変更が行われるときは、速やかに被験者に情報提供し、研究に参加するか否かについて被験者の意思を予め確認するとともに、事前に審査委員会承認を得て同意説明文書等の改訂を行い、被験者の再同意を得ることとする。

(14) 被験者の研究参加予定期間

各被験者は同意後、5年の観察期間で参加する

C. 研究結果

(1) 制御性T細胞の*ex vivo*誘導

本年度末までに 10 例の肝移植症例において誘導した培養細胞の基礎データおよび制御性 T 細胞の増加率につきデータのまとめを表 1 に示す。臨床試験症例 4 例目以降では、輸注可能な培養細胞をより増やすことを主目的とし、肝移植当日に摘出した脾臓を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、翌日に細胞を共培養に添加している。

10 例の肝移植症例における培養開始時の総リンパ球数は $9.3 \pm 2.2 \times 10^9$ 個であり、レシピエントリンパ球数 $5.9 \pm 2.1 \times 10^9$ 個は 2 週間後に $1.4 \pm 0.8 \times 10^9$ 個へと減少した。しかし、 $CD3^+CD4^+$ T 細胞および $CD3^+CD8^+$ T 細胞は、各々 $30.3 \pm 9.6\%$ から $59.5 \pm 13.5\%$ へ、 $11.8 \pm 8.0\%$ から $17.8 \pm 10.8\%$ へ増加した。また、 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 制御性 T 細胞は、 $6.7 \pm 3.8\%$ から $28.1 \pm 17.7\%$ と、培養開始時に比べ 2.4 ~ 8.8 倍増加した (表 2)。同様に、 $CD4^+CD25^+CTLA4^+$ 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。即ち、抗 CD80 および抗 CD86 抗体存在下に放射線照射ドナー末梢血単核球細胞 (PBMC) と

表 1. 臨床試験症例における培養細胞のデータ (症例 #1- #10)

培養細胞	Phenotype	培養開始時	2週間培養後
ドナーリンパ球数 ($\times 10^9$)	-	3.5 ± 0.8	-
レシピエントリンパ球数 ($\times 10^9$)	-	5.4 ± 2.3	1.4 ± 0.8
Cell viability (%)	-	98.5 ± 1.6	87.1 ± 8.9
CD4 ⁺ T cell (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺	30.3 ± 9.6	59.5 ± 13.5
CD8 ⁺ T cell (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺	11.7 ± 8.2	17.8 ± 10.8
B cell (%)	CD3 ⁺ CD19 ⁺	6.6 ± 4.2	4.8 ± 2.3
NK cell (%)	CD3 ⁺ CD16 ⁺ 56 ⁺ CD45 ⁺	7.6 ± 3.9	4.8 ± 2.2
Monocyte (%)	CD14 ⁺ SCC ^{mid}	21.1 ± 14.4	5.0 ± 5.1
Myeloid DC (%)	Lin1 ⁻ CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	0.9 ± 0.6	0.4 ± 0.4
Plasmacytoid DC (%)	Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	0.5 ± 0.3	0.1 ± 0.1
Tregs (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	6.7 ± 3.8	28.1 ± 17.7
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺	5.6 ± 3.6	29.3 ± 17.3
	CD4 ⁺ CD127 ^{lo} Foxp3 ⁺	8.2 ± 6.0	26.2 ± 17.7

表2. 臨床試験症例における制御性T細胞誘導率(Case #1- #10)

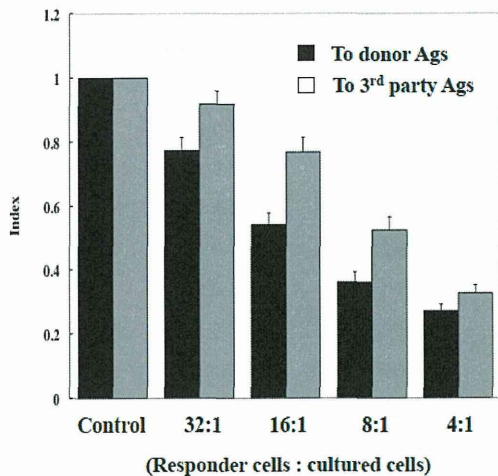
症例	Treg phenotype	Day 0 (%)	Day 14 (%)	Fold increase
#1	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	4.5	12.2	2.7
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺	3.5	25.0	7.1
	CD4 ⁺ CD127 ^{lo} Foxp3 ⁺	0.2	16.0	80.0
#2	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	3.2	28.1	8.8
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺	4.0	21.7	5.4
	CD4 ⁺ CD127 ^{lo} Foxp3 ⁺	0.4	23.4	58.5
#3	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	2.6	18.0	6.9
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺	2.0	33.1	16.6
	CD4 ⁺ CD127 ^{lo} Foxp3 ⁺	2.5	13.2	5.3
#4	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	7.1	27.9	3.9
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺	4.3	27.7	6.4
	CD4 ⁺ CD127 ^{lo} Foxp3 ⁺	13.6	26.5	2.0
#5	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	6.4	8.8	1.4
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺	4.7	9.5	2.0
	CD4 ⁺ CD127 ^{lo} Foxp3 ⁺	8.1	4.1	0.5
#6	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	5.4	35.9	6.7
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺	3.1	27.7	8.9
	CD4 ⁺ CD127 ^{lo} Foxp3 ⁺	6.5	30.2	4.7
#7	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	7.1	19.2	2.7
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺	4.9	15.1	3.1
	CD4 ⁺ CD127 ^{lo} Foxp3 ⁺	8.4	18.0	2.1
#8	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	16.1	64.8	4.0
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺	14.5	43.9	3.0
	CD4 ⁺ CD127 ^{lo} Foxp3 ⁺	19.0	66.0	3.5
#9	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	6.8	16.4	2.4
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺	7.5	24.2	3.2
	CD4 ⁺ CD127 ^{lo} Foxp3 ⁺	11.3	19.6	1.7
#10	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	7.9	49.9	6.3
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺	7.8	52.6	6.7
	CD4 ⁺ CD127 ^{lo} Foxp3 ⁺	12.4	44.9	3.6

レシピエント PBMC (+脾細胞)を2週間共培養する本培養系により、制御性T細胞が選択的に誘導されていた。

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)。培養細胞添加により、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く、培養制御性T細胞は抗原特異性が比較的高い細胞であることが示唆された。なお、症例5では、制御性T細胞は誘導されず、ドナー抗原に対するMLR抑制も不良であった(図5)。

図4. 培養細胞によるMLR抑制能

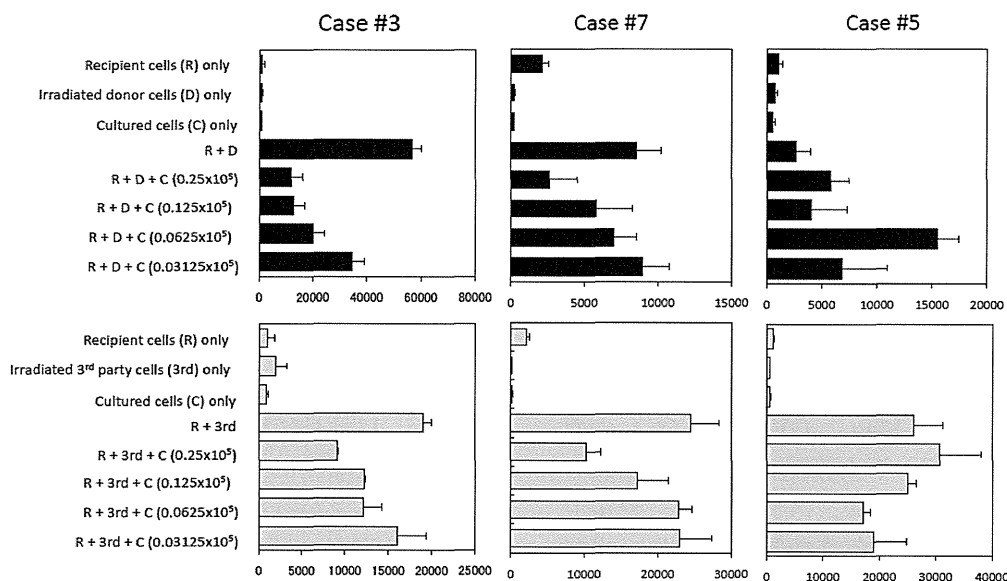


(2) 肝移植症例における培養制御性T細胞を用いた免疫抑制療法

今年度末までに生体肝移植患者10例において制御性T細胞を用いた本治療法を施行した(表3・表4)。

症例1: 39歳、男性。C型肝硬変(Child C、MELD: 16)に対し、弟の肝左葉グラフトを用いた生体肝移植術を施行した。プロトコル通りにプログラフ、ステロイド、セルセプトの3剤で免疫抑制を開始し、術後4および

図5. 培養細胞によるMLR抑制能



5日目にエンドキサン 25 mg/kgを投与した。11日目にセルセプトを中止し、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。ステロイドは漸減し、28日目にはプログラフ単剤での免疫抑制となった。術後34日目にCMV antigenemia陽性となり、CMV hepatitisを併発し、免疫抑制を完全に中止した。術後は一過性に低値となっていた血中

HCV-RNA値が6台まで上昇し、C型肝炎再発疑われ、DFPPを計3回施行した。術後8週目頃より、IFN- γ ELISPOTでdirectおよびindirect responseともにドナー抗原に対する反応は上昇し、術後65日目にMild ACRと診断された。ソルコーテフ投与後、プログラフによる免疫抑制を再開した。その後は肝機能も安定したまま順調に経過し退院となった。術後98日目の肝生検でC型肝炎再発が

表3. 臨床試験症例

症例	年齢/性	原疾患	Child /MELD	移植日	ドナー	HLA MM	GV/SV	CPA (mg/kg)	輸注細胞数	脾細胞併用
#1	39/M	LC (HCV)	C/16	2010.11.30	弟	0	30.7%	25, x2	0.61 x10 ⁹	無し
#2	63/M	LC (alcoholic)	C/14	2011.2.15	息子	3	28.6%	25, x2	2.54 x10 ⁹	無し
#3	56/M	LC (NASH)	C/18	2011.3.15	息子	4	34.4%	30, x1	0.79 x10 ⁹	無し
#4	59/M	LC (HBV), HCC	C/15	2011.6.28	義息子	7	32.6%	40, x1	2.45 x10 ⁹	有り
#5	52/M	PBC	C/15	2011.9.20	兄	0	27.7%	40, x1	0.63 x10 ⁹	有り
#6	55/F	PSC	C/18	2011.11.2	娘	4	30.7%	40, x1	1.18 x10 ⁹	有り
#7	59/F	LC (NASH), HCC	B/12	2011.11.22	娘	4	29.8%	40, x1	2.59 x10 ⁹	有り
#8	56/M	LC (alcoholic)	C/21	2012.2.7	息子	3	42.7%	40, x1	0.70 x10 ⁹	有り
#9	58/F	PBC	C/25	2012.4.10	息子	5	39.0%	40, x1	0.59 x10 ⁹	有り
#10	55/M	LC (NASH), HCC	B/12	2012.7.24	息子	4	32.7%	40, x1	1.20 x10 ⁹	有り

疑われ、インターフェロン・リバビリン治療を開始した。肝機能良好にて術後6ヶ月目よりプログラフ減量開始。減量中も拒絶反応を認めず、術後21ヶ月目より免疫抑制フリーとなった。現在、免疫抑制剤中止から8ヶ月経過しているが、肝機能安定しており、拒絶反応の兆候は認められていない。

症例2：63歳、男性。アルコール性肝硬変(Child C、MELD：14)に対し、息子の肝左葉グラフトを用いた生体肝移植術を施行した。本症例は過小グラフト(GV 344g、GV/SV 28.6%)のため、門脈—下大静脈シャントを増設した。プログラフ、ステロイド、セルセプトの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。血清肝逸脱酵素値は順調に低下していたが、体位変換を契機にグラフト裂傷をきたし、AST/ALTは再上昇した。エンドキサン投与によりWBCは400 /mm³まで低下し、G-CSF投与が必要であった。11日目にセルセプトを中止し、13日目に予定通り、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。ステロイドも漸減し、17日目にはプログラフ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。MLR、IFN- γ ELISPOTともにドナー抗原に対する反応は陰性であった。肝生検ではmild ACRと診断され、ソルコーテフ投与後、プログラフをtrough値 7-8 ng/mlまで増量した。術後22日目に門脈—下大静脈シャント閉鎖術を施行。一過性に再上昇していたAST/ALTはその後漸減、全身状態も安定し、退院。術後6ヶ月目よりプログラフ減量を開始。外来通院にて定期的に肝機能チェックしているが、拒絶反応を認めず経過。術後約1年6ヶ月目から免疫抑制剤を中止

した。その後、グラフト中肝静脈血栓症に起因する血清AST/ALT値の上昇を一過性に認めたが、現在、術後約1年9ヶ月経過し、免疫抑制剤中止から8ヶ月になるが肝機能は安定している。

症例3：56歳、男性。NASH肝硬変(Child C、MELD：18)に対し、息子の肝左葉グラフトを用いた生体肝移植術を施行した。プロトコール通りにプログラフ、ステロイド、セルセプトの3剤で免疫抑制を開始した。術後7日目に、エンドキサン 30 mg/kgを1回投与し、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。培養細胞輸注後は末梢血液中の制御性T細胞は上昇した。術後15日目にセルセプトを中止した。錐体外路症状を主体とする神経症状が出現したため、術後20日目にプログラフ投与を中止し、ステロイド単剤での免疫抑制を行った。MLR、IFN- γ ELISPOTともにドナー抗原に対する反応は陰性であったが、26日目よりAST/ALT値が軽度上昇し、ネオーラル投与を開始した。翌日、肝生検を施行するも拒絶反応を認めず、脂肪肝と診断された。ステロイドを漸減し、術後30日目に投与を中止した。その後、AST/ALT値は漸減し、神経症状も改善していった。術後74日目に右横隔膜下膿瘍に対し、開胸開腹下に膿瘍ドレナージ術を施行。その後は肝機能も安定したまま順調に経過し、術後術後107日目に退院した。免疫抑制はネオーラル単剤、200 mg/dayで外来フォローとなった。術後6ヶ月目よりネオーラル減量を開始するも拒絶反応を認めず、術後19ヶ月目にネオーラルを中止した。現在、免疫抑制剤中止から約7ヶ月経過しているが、拒絶反応の兆候なく肝機能も安定している。

表4. 臨床試験症例の経過まとめ

2013年5月2日現在

症例	移植後 日数	Clinical events	免疫抑制剤/日 (trough-ng/ml)		現在のLFTs AST/ALT/γ-GPT (IU/L)	免疫抑制剤 中止後日数
			ピーク時	現在		
#1	884	POD 35: CMV感染症・肝炎→IS off POD 65: mild ACR → FK再開 POD 98: HCV再発 → IFN開始 POD 640: IS (FK) off	PSL: 20 mg MMF: 1000 mg FK: 6 mg (16.8)	0 mg 0 mg 0 mg	25/20/16	244
#2	807	POD 19: mild ACR POD 22: 再開腹、P-C shunt閉鎖 POD 567: IS (FK) off POD 608: Graft MHV thrombus	PSL: 20 mg MMF: 1000 mg FK: 2.2 mg (10.3)	0 mg 0 mg 0 mg	24/22/12	240
#3	779	POD 14: 瘻体外路症状 POD 20: FK中止, POD 26: CsA開始 POD 567: IS (CsA) off POD 716: SMV thrombus	PSL: 20 mg MMF: 1000 mg FK: 5.5 mg (9.6) CsA: 300 mg (322)	0 mg 0 mg 0 mg 0 mg	22/22/64	216
#4	674	DM、腎症でHD中 POD 25: 左心不全 POD 34: FK off→RAPA開始 POD 53: RAPA off→FK再開 POD 539: IS (FK) off	PSL: 20 mg MMF: 1000 mg FK: 2.4 mg (12.2) RAPA: 1 mg	0 mg 0 mg 0 mg 0 mg	13/7/7	135
#5	590	POD 377: FK 3 mg, 2x/wkへ減量 POD 394: mild ACR→FK増量	PSL: 20 mg MMF: 1000 mg FK: 7.5 mg (12.5)	0 mg 0 mg 5 mg, qd (7.2)	18/8/20	-
#6	548	POD 206: 胸神経叢炎 POD 268: IS (FK) off POD 311: mild ACR→RAPA開始 POD 326: PSL再開 POD 352: RAPA off→CsA開始	PSL: 20 mg MMF: 1000 mg FK: 7.5 mg (15.1) RAPA: 4 mg (14.3) CsA: 200 mg (146)	2.5 mg 0 mg 0 mg 0 mg 75 mg, 3x/wk (32)	32/29/18	-
#7	527	POD 28: 脂肪肝 POD 153: 胆管炎、CMV感染 POD 461: FK 2 mg, 1x/wkへ減量	PSL: 20 mg MMF: 1500 mg FK: 4.5 mg (15.3)	0 mg 0 mg 2 mg, 1x/wk (<1.5)	26/21/26	-
#8	450	POD 52: 脳症(PRES) POD 60: FK off, POD 65: CMV感染 POD 79: mild ACR→RAPA開始 POD 93: RAPA off, POD 107: CsA開始 POD 377: CsA 75 mg, 3x/wkへ減量	PSL: 20 mg MMF: 1000 mg FK: 7.5 mg (19.8) RAPA: 2 mg CsA: 200 mg (251)	0 mg 0 mg 0 mg 0 mg 75 mg, 3x/wk (116)	23/22/15	-
#9	387	POD 13: 肝動脈再吻合 POD 125: CMV感染 POD 289: FK 2 mg, 3x/wkへ減量 POD 365: mild ACR→FK増量	PSL: 20 mg MMF: 1000 mg FK: 3.2 mg (18.5)	0 mg 0 mg 4 mg, qd (5.1)	25/20/69	-
#10	282	POD 38: 退院 POD 282: FK 2 mg, 3x/wkへ減量	PSL: 20 mg MMF: 1500 mg FK: 5 mg (15.9)	0 mg 0 mg 3 mg, 3x/wk (4.7)	24/21/16	-

症例4: 59歳、男性。B型肝炎硬変・肝細胞癌(Child C、MELD: 15)に対し、義息子の肝左葉グラフトを用いた生体肝移植術を施行した。プログラフ、ステロイド、セルセプトの3剤で免疫抑制を開始し、術後5日目にエンドキサン 40 mg/kgを投与した。経過中、糖尿病性腎症を基礎とする腎不全を併発したため透析を導入した。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。術後24日目に急性心不全による肺水腫を併発した。ステロイドはプロトコールに従い中止した。肝機能は一貫して安定していたが、プログラフによる心毒性を危惧し、術後34日目に中止、セルセプト1000 mg/dayに37日目からはラパマイシン1 mgを併用し、免疫抑制療法を行った。心機能改善し安定したため、術後53日目よりラパマイシンを中止し、55日目から再度プログラフへ切り替えた。術後71日目からセルセプトを中止し、プログラフ単剤で免疫抑制を維持した。術後は拒絶反応を

来すことなく経過し、術後112日目に退院となった。術後6ヶ月目よりプログラフ減量を開始するも血液検査や肝生検にて拒絶反応を認めていない。現在、免疫抑制中止から約4ヶ月経過しているが、拒絶反応の兆候なく肝機能は良好である。

症例5: 59歳、男性。PBC(Child C、MELD: 15)に対し、兄の肝左葉グラフトを用いた生体肝移植術を施行した。プログラフ、ステロイド、セルセプトの3剤で免疫抑制を開始し、術後5日目にエンドキサン40 mg/kgを投与した。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18日目にセルセプトを中止、ステロイドもプロトコールに従い漸減し、28日目にはプログラフ単剤での免疫抑制となった。経過中、拒絶反応や感染症を認めず、術後57日目に退院となった。退院後も拒絶反応を認めず経過し、術後約6ヶ月目よりプログラフ減量を開始した。術後12ヶ月目よりグラセプター 3 mg/dayを週2回

投与まで減量したが、減量から2週間後に血清AST/ALT値が軽度上昇し、肝生検にてmild ACRと診断されステロイドパルス治療およびグラセプター増量で治療を行った。現在、グラセプター5 mg/dayを服用 (FK trough: 7.2 ng/ml)で肝機能は非常に安定している。

症例6 : 55歳、女性。PSC (Child C、MELD : 18)に対し、娘の肝左葉グラフトを用いた生体肝移植術を施行した。プログラフ、ステロイド、セルセプトの3剤で免疫抑制を開始し、術後5日目にエンドキサン40 mg/kgを投与した。術後13日目に培養リンパ球を輸注し、これに伴う明らかな副作用を認めなかった。術後18日目にセルセプトを中止、ステロイドもプロトコールに従い漸減し、術後28日目にはプログラフ単剤での免疫抑制となった。経過中、拒絶反応や感染症を認めず、術後42日目に退院。プロトコールに従い、術後約6ヶ月目よりプログラフ減量を開始するも7ヶ月目に腕神経叢炎を併発した。タクロリムス副作用を疑い、術後268日目にこれを中止し免疫抑制フリーとした。術後311日目にAST/ALT値の上昇を認め、肝生検にてmild ACRの診断でラパマイシンを開始。経過中、AST/ALT再上昇認められ、プレドニン 20 mg/dayを追加した。肝機能が安定した事を確認。術後352日目にラパマイシンをネオオーラルにスイッチし、プレドニンを漸減・中止したところ腕神経叢炎に伴う両側手指しびれが再燃。プレドニン5 mg/dayを再開、症状軽減傾向となったため1週間後にプレドニンを2.5 mg/dayへ減量した。術後1年5ヶ月目に肝生検を行い、拒絶反応の兆候無いことを確認し、ネオオーラル75 mgを週3回服用へ減量 (trough level: 31.6 ng/ml)。現在、1ヶ月経過しているが、拒絶反応の兆候なく肝機能は安定しており、神経症状もほぼ消失している。

症例7 : 59歳、女性。NASH+HCC (Child B、MELD : 12)に対し、娘の肝左葉グラフトを用いた生体肝移植術を施行した。プログラフ、ステロイド、セルセプトの3剤で免疫抑制を開始し、術後5日目にエンドキサン40 mg/kgを投与した。術後13日目に予定通り、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。セルセプトは細胞輸注当日に中止した。術後は脾臓摘出に起因する臍液瘻を併発したが、術後16日目より経口摂取を開始した。ステロイドもプロトコールに従い漸減し、術後28日目にはプログラフ単剤での免疫抑制となった。術後1ヶ月目の肝生検で高度脂肪肝みられたが、拒絶反応を示唆する所見は認められなかった。その後も、拒絶反応や感染症を認めず、経過良好にて術後63日目に退院となった。術後3ヶ月経過した際にVGCVの予防投与を中止した。術後149日目に胆管炎およびCMV感染を併発し再入院となったが、抗生剤・GCV投与で軽快した。術後6ヶ月目よりプログラフ減量を開始し、プロトコールに従いこれを漸減。免疫抑制剤減量中も拒絶反応を認めず、術後1年3ヶ月経過した時点でグラセプター2 mg、週1回投与へ減量を行った。現在、免疫抑制剤減量から更に約2ヶ月経過し、肝機能も安定しており、1ヶ月後には免疫抑制剤中止を予定している。

症例8 : 52歳、男性。アルコール性肝硬変(Child C、MELD : 21)に対し、息子の肝左葉グラフトを用いた生体肝移植術を施行した。プログラフ、ステロイド、セルセプトの3剤で免疫抑制を開始し、術後5日目にエンドキサン40 mg/kgを投与した。エンドキサン投与により術後13日目にWBCは400 /mm³まで低下し、セルセプトを中止した。同日、血清AST/ALT値が1329/832 IU/Lと急上昇し、肝生検を施行。Mod-

severe ACRの所見に加え中心静脈周囲広汎の肝細胞脱落を認め、薬剤性肝障害も疑われた。予定通りに培養リンパ球を輸注したが、細胞輸注に伴う明らかな副作用は認められなかった。Solumedrol 1gを3日間投与し、血漿交換を3日間行った。その後、血清肝逸脱酵素値は低下し、術後3週間日目にはほぼ正常値まで復した。ステロイドはプロトコールに従い漸減し、術後30日目に中止した。この間、免疫抑制はプログラフ単剤で維持した。術後39日目に汎血球減少のため、GCV予防投与を中止した。術後41日目より副腎不全の診断でプレドニンを10 mg/dayで再開し、症状軽快と共にステロイドを漸減した。術後52日目に中枢性無呼吸および不随意運動を認めPRESが疑われた。FK脳症は否定出来ない状況から、術後60日目にプログラフを中止し、プレドニン単剤 10 mg/dayで免疫抑制を維持した。術後65日目にCMV antigenemia陽性となり、GCVを再開、74日目にはプレドニンを5 mg/dayに減量した。CMV感染は軽快傾向であったが、術後78日目に血清AST/ALT値が軽度上昇し、肝生検にてMild ACRと診断され、soluortef 500 mgを投与し、ラパマイシンを開始した。ラパマイシン 2 mg/day, プレドニン 10 mg/dayで免疫抑制を維持し肝機能は安定。神経症状も改善傾向となり、術後93日目にラパマイシンを中止し、ネオーラルへスイッチした。術後9ヶ月目よりネオーラル 100 mg, bid投与(trough level 134.5 ng/ml)とし、その後はプロトコールに従い減量を進めた。術後1年目よりネオーラル 75 mg, 週3回投与に減量するも肝機能は安定しており、近々、ネオーラル週2回投与への減量を予定している。

症例9 : 58歳、女性。PBC (Child C、MELD : 25)に対し、息子の肝左葉グラフトを用いた生体肝移植術を施行した。

プロトコール通りにプログラフ、ステロイド、セルセプトの3剤で免疫抑制を開始。術後5日目にエンドキサン 40 mg/kgを投与し12日目にセルセプトを中止した。翌日、肝動脈狭窄を併発し、開腹にて肝動脈再吻合術を要したため、術後14日目に培養細胞を輸注した。拒絶反応なく経過し、術後51日目からプログラフ単剤での免疫抑制となった。術後6ヶ月目よりプログラフ減量を開始。術後9ヶ月目からはグラセプター 2 mgを週3回投与へ減量。FK trough値は0.9-2.0 ng/mlで推移し、肝機能も良好であったが、減量から7週目に血清AST/ALT/ γ -GTP値が44/45/49 IU/Lへ軽度上昇。肝生検にてmild ACRの診断で、ソルメドロール 1g投与の上、グラセプター 4 mg (FK trough; 5.1 ng/ml)、1日1回投与へ増量し、現在、肝機能は改善している。

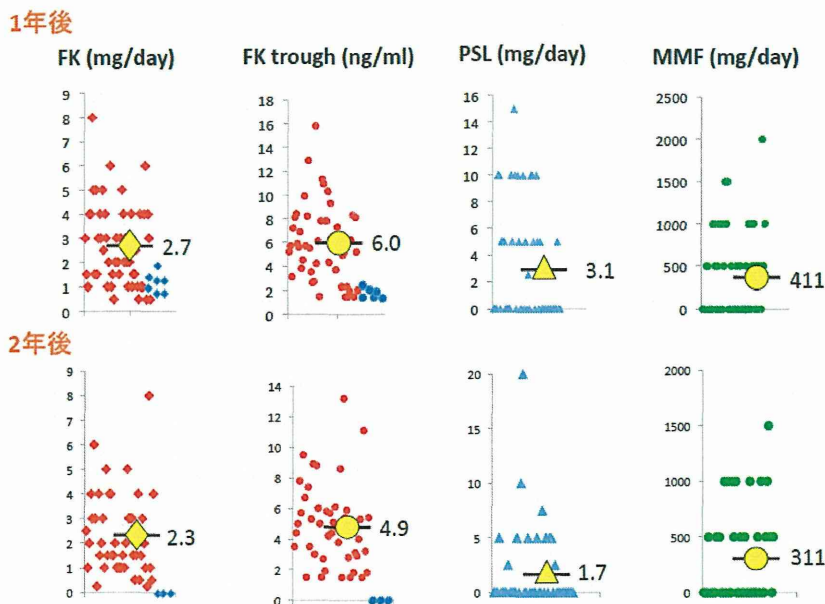
症例10 : 55歳、男性。NASH肝硬変 (Child B、MELD : 12)+ HCC (Milan基準内)に対し、息子の肝左葉グラフトを用いた生体肝移植術を施行した。プロトコール通りにプログラフ、ステロイド、セルセプトの3剤で免疫抑制を開始。術後5日目にエンドキサン 40 mg/kgを投与し、術後11日目にセルセプトを中止した。術後13日目に予定通り、培養リンパ球を輸注した。細胞輸注に伴う明らかな副作用は認められなかった。ステロイドも予定通り漸減し、術後30日目にはプログラフ単剤での免疫抑制となり、37日目に退院した。外来フォロー中も拒絶反応の兆候無く経過し、術後6ヶ月目よりプログラフ減量を開始した。術後9ヶ月目の肝生検でも拒絶を示唆する所見を認めず、グラセプター 2 mgを週3回投与(FK trough: 4.7 ng/ml)で肝機能は安定している。

D. 考察

本研究では、生体肝移植症例において *ex vivo* 誘導制御性 T 細胞を用い、本細胞治療の安全性および有効性について検討した。平成 22 年 11 月より昨年度末までに計 10 例の生体肝移植症例において本臨床試験を施行した。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 細胞が高率に誘導された。症例 4 以降の症例では、レシピエント脾細胞も加え、制御性 T 細胞の増量を図った。全症例において、細胞輸注に伴う副作用は認められず、本治療法は安全であることが示された。細胞治療の有効性については、早期の i) 免疫抑制剤減量および ii) 免疫抑制剤中止と免疫寛容誘導が可能かという点に重きを置き検討を行った。10 症例中、9 症例で術後 6 ヶ月目にはカルシニューリン阻害剤単剤での免疫抑制剤となり、プロトコールに従った薬剤減量が可能であった。従来で従来の免疫抑制療法を施行した成人生体肝移植 54 症例の免疫抑制剤使用量を図 7 に示す。これら症例のタ

クロリムス投与量と血中 trough 値は術後 1 年目で平均 2.7 mg/day, 6.0 ng/ml、2 年目は平均 2.3 mg/day, 4.9 ng/ml であった。また、術後 1 年目および 2 年目のステロイド投与量は各々平均 3.1 mg/day と 1.7 mg/day、MMF 投与量は平均 411 mg/day と 311 mg/day であることを考えると、本臨床試験症例では非常に少ない量の免疫抑制剤にもかかわらず拒絶反応は見られずに肝機能も良好に維持されており、免疫抑制剤の減量に成功していると考えられた。免疫抑制剤中止・免疫寛容については、現時点で既に 4 例がこれを達成している。これらの症例で免疫寛容、いわゆる *operational tolerance* が誘導されているのか、後続の症例も免疫抑制フリーとなり得るのかという点を確認するまでには今後更に 1 年程度の観察期間が必要であるが、現時点において本研究の目的は順調にかつ概ね達成できているものと考ええる。なお、移植後 3 年以上経過している成人脳死肝移植症例を対象とした免疫抑制剤を積極的に中止する他施設共同試験の結果が最近報告されたが、免疫寛容誘導例は 40.2%で

図7. 生体肝移植後における従来法での免疫抑制剤服用量との比較



あったものの、移植後3年から5.7年の間に免疫抑制剤の減量をはかった症例では免疫抑制剤中止成功例は12.5%に過ぎない。本臨床試験では、既に現時点において4例(40%)が術後1年6~9ヶ月後には免疫抑制から完全離脱していることを考慮すると、本細胞治療の免疫寛容誘導効果についても有効性が示されているものと考えられる。

術後6ヶ月経過し、カルシニューリン阻害剤の減量を開始後に、10症例中2例(症例5および症例9)で拒絶反応が認められた。両症例とも拒絶反応の程度は弱く、ステロイドのボラス投与後にカルシニューリン阻害剤を増量することで速やかにコントロール可能であり、以後は拒絶反応を認めず肝機能は安定して推移している。症例5では、 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 制御性T細胞は6.4%から8.8%と誘導効率が悪く、培養細胞添加によるMLR抑制も得られなかった症例である。また、症例9は輸注した培養細胞の数が 0.59×10^9 個と10症例中で最も少なかった症例である。これらの要因が免疫抑制剤減量・中止の正否を左右した可能性がある。また、両症例はともにPBC症例

である。一般にPBC症例は免疫反応が強いことや再発のリスクから、本試験のような免疫抑制剤減量トライアルの対象には含まれない原疾患の一つである。PBC症例に対する本細胞治療の有効性については症例を増やさなければ結論は得られないが、今後はPBC用例を対象に含むべきかどうか再考を要する。

制御性T細胞を用いた新しい免疫抑制療法を施行した生体肝移植10症例において、Cylex、MLR、IFN- γ ELISPOT、FACSによる抗原特異的 $CD4^+CD154^+$ T細胞、制御性T細胞、ナイーブ、記憶T細胞の観察による免疫モニタリングを行った。本研究ではドナーが生体であることから、ドナーリンパ球を必要に応じて採取し、ドナー抗原に対する反応を観察し得た。今回、経過中に急性細胞性拒絶反応(ACR)を来した症例は10例中6例であった。このうち4例において拒絶反応を来す直前にドナー抗原に対するMLR、IFN- γ ELISPOT、CD154の発現のいずれかの上昇が観察された。また、ACR直前には非特異的免疫反応であるCylexの上昇も6例中4例に観察し

図8. 末梢血液中 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 制御性T細胞の術後推移

