

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)

臓器移植・造血細胞移植後日和見感染症に対する有効かつ
安全な多ウイルス特異的T細胞療法の開発と導入に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森 尾 友 宏

平成 26 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

**難治性疾患等克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)**

**臓器移植・造血細胞移植後日和見感染症に対する有効かつ安全な多ウイルス
特異的 T 細胞療法の開発と導入に関する研究**

目 次

I.	班員・協力者名簿	5
II.	総括研究報告	9
	臓器移植・造血細胞移植後日和見感染症に対する有効かつ安全な多ウイルス特異的 T 細胞療法の開発と導入に関する研究 森尾友宏 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野)	
III.	分担研究報告	
	森尾友宏 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野)	17
	高橋 聡 (東京大学医科学研究所先端医療研究センター分子療法分野)	21
	高橋義行 (名古屋大学大学院医学系研究科)	25
	立川 愛 (東京大学医科学研究所先端医療研究センター)	29
	服部元史 (東京女子医科大学腎臓小児科)	33
	水田耕一 (自治医科大学移植外科)	39
IV.	研究成果の刊行に関する一覧表	45
V.	研究成果の刊行物・別刷	51

班員・研究協力者名簿

班員・研究協力者名簿

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	森尾友宏	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野	准 教 授
研究分担者	高橋 聡	東京大学医科学研究所	准 教 授
	高橋 義行	名古屋大学大学院医学系研究科	准 教 授
	立川 愛	東京大学医科学研究所先端医療研究センター	准 教 授
	服部元史	東京女子医科大学腎臓小児科	教 授
	水田 耕一	自治医科大学移植外科	准 教 授
研究協力者	長村文孝	東京大学医科学研究所	教 授
	藤田由利子	東京大学医科学研究所	研究レジデント
	小野敏明	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野	大 学 院 生
	熊木恵里	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野	大 学 院 生
	清水則夫	東京医科歯科大学大学難治疾患研究所ウイルス治療学分野	准 教 授
事 務 局	森尾友宏	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野	
		〒113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45 TEL&FAX:03-5803-5245	
	星川あき子	E-mail:ahosikawa.cct@tmd.ac.jp	
	渡邊明子	E-mail:lala0801.cct@tmd.ac.jp	
経理事務担当者	鈴木亜耶	国立大学法人東京医科歯科大学	
		研究・産学連携推進機構事務部	
		研究推進掛	
		〒113-8510	
		東京都文京区湯島 1-5-45	
		TEL : 03-5803-5872・7162	
		FAX : 03-5803-0179	
E-mail : ayasuzuki.adm@cmn.tmd.ac.jp			

總括報告書

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)
総括研究報告書

臓器移植・造血細胞移植後日和見感染症に対する有効かつ安全な多ウイルス
特異的T細胞療法の開発と導入に関する研究

研究代表者 森尾友宏

(東京医科歯科大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野 准教授)

研究要旨:

造血細胞移植、臓器移植後の日和見感染症対策として、迅速体系的ウイルス測定系を brush up し、臓器移植後患者の解析を実施できる体制を構築した。さらにウイルスに対する治療として、特定の HLA を有するものに対して比較的安価かつ迅速に CTL を作成できる第一世代特異的 CTL 療法を導入し、臨床的知見を深めた。さらに最終目的である多ウイルス特異的 T 細胞調製 (HLA にかかわらず特異的 T 細胞を作製できる手法) においては、ADV, EBV, CMV に対する特異的な T 細胞を調製できることを確認し、細胞内 IFN- γ 産生測定法や ELISpot アッセイを用いて、各抗原に対する特異的 T 細胞の比率を算定した。その結果約 20-50% の特異的 T 細胞を得て、それを最高 1000 倍にまで増幅することが可能であった。また増幅した T 細胞の特異的標的に対する細胞傷害活性や、アロ反応性の欠如を証明した。臨床応用に向けて細胞培養は無血清化することに成功し、また GMP grade のガス透過性フラスコでの培養系に移行して、標準作業手順書を用意しつつ、来年度の臨床応用に向けて準備を進めた。

研究分担者氏名

高橋 聡：東京大学医科学研究所先端医療
研究センター分子療法分野
准教授

立川 愛：東京大学医科学研究所先端医療
研究センター感染症分野
准教授

高橋義行：名古屋大学医学部小児科学
成長発達医学 准教授

服部元史：東京女子医科大学腎臓小児科
教授

水田耕一：自治医科大学移植外科 准教授

A. 研究目的

造血細胞移植の成績は、前処置の最適化、適

切な移植源選択や免疫抑制薬の使用などにより向上している。しかし原疾患再発、生着不全や移植関連合併症などにより、その成績は未だに不十分である。中でも**移植後の日和見感染症は予後や移植後の生活の質に大きく関与**する。CMV、EBV、アデノウイルス(ADV)に加え、BKV、HHV6などによる感染症も大きな問題となっている。

肝移植や腎移植の生着率も90%に近づこうとしている。一方生涯に亘り免疫抑制薬が必要であり、日和見感染症が臓器の廃絶や治療抵抗性感染症という面から克服すべき重要課題として残されている。

ウイルス感染治療には、有効な治療薬の欠如(ADV, BKV, EBVなど)、長期投与による薬

剤耐性（CMVなど）、費用対効果など様々な問題を有している。GVHDや拒絶に影響を与えないウイルス特異的免疫療法はこれらの問題を根本的に解決する方策である。欧米では造血細胞移植分野で実臨床応用され効果をあげているが、日本は明らかに遅れをとっている。

本研究では移植領域全体の成績向上を最終目標とし、ウイルス特異的T細胞療法、特に短期間に増幅可能かつプラスミドやウイルスによる刺激を用いない、特異的T細胞療法の開発と導入を目的として研究を実施する。

具体的には、本研究では（1）臓器移植後日和見感染症の実態を把握し、（2）第一世代EBV、CMV特異的T細胞について臨床研究の中で有効性評価系・搬送系を確立し、（4）第二世代の3ウイルス特異的T細胞では細胞傷害活性、アロ反応評価系、無血清化を評価し、（5）最終的には臨床研究に進むと共に、7ウイルス特異的T細胞療法を確立する。

B. 方法

目的の達成のため、以下の方法を用いて検討を行う。

1. 臓器移植後・造血細胞移植(SCT)後日和見感染モニタリング（水田、服部、高橋聡、森尾）

SCT後では既に約500名（900検体）にて15ウイルス測定を実施している。一方、臓器移植後の多項目検査報告は少ない。まず肝臓移植後、腎臓移植後様々な時期で15ウイルス検出を行い（cross sectional study）また新規倫理審査委員会にprospective studyの申請を行った後に、今後移植を行う患者において移植前後のウイルス感染症モニタリングを行う。ウイルス検査は今までに行って方法に準じて、multi-stripあるいはmulti-well固相化試薬を用いて、リアルタイムPCRを実施する。方法については年内を目処に、核酸抽出、分注、リアルタイムPCR、結果解析までの全解析系を全自動化する。

2. 臓器移植後細胞療法におけるアロ反応検証系の確立（水田、服部、立川）

臓器移植後では拒絶促進が最も懸念される。原材料（血液）としてはレシピエント（リスク：拒絶）、ドナー（リスク：GVHD）の両者の可能性があるが、アロ反応性を最小限にする方策を模索すると共に、新規細胞傷害活性測定法や、CFSE系で簡便・高感度で反応を検出する方法を検証する。前者においては通常の⁵¹Cr遊離試験に加えて、caspase 3の細胞内染色、あるいはcaspase 3の基質を標的細胞（この場合はアロ細胞）にパルスし、caspase 3が活性化されるとその基質が分解されて蛍光を発生することを利用した検出方法、などを用いる。

3. EBV、CMV特異的T細胞の臨床研究（第一世代特異的T細胞）（高橋義）

EBV、CMV特異的T細胞療法は名古屋大学で開発され、GMP準拠施設で調製、臨床研究が実施されている。本治療方法ではHLAに対応したペプチドを用い、T細胞にパルスして抗原提示細胞とし、増殖した特異的T細胞を抗CD3抗体とIL-2で培養することにより、特異的T細胞を増幅して使用する。本研究の中では、さらに症例数を重ねつつ、有効性、有害事象評価系と搬送系を確立する。特に後者ではカテゴリーB対応搬送における予備実験を実施しつつ、広域における妥当な搬送系を確立する。

4. 3ウイルス特異的T細胞培養法の確立（第二世代）（高橋聡、立川、森尾）

1) 細胞調製と特性評価

3ウイルス7抗原特異的T細胞調製についての基礎検討を行う。具体的にはEBV(LMP2, EBNA1, BZLF1), CMV(pp65, IE6), AdV(penton, hexon)の領域をカバーする11アミノ酸ずつoverlapする15merのペプチドを用い、末梢血単核球と共培養する。この培養系にはIL-4 (1,600 IU/mL), IL-7 (900 IU/mL)を添加したAIM-5培地を用いる。10日から12日後に細胞を収集し、その表面抗原特性、特異的T細胞の比率や産生する整理活性物質などを詳細に検証する。特異的T細胞の比率は、ペプチドパルス後の細胞内IFN- γ やIFN- γ ELISpot assayで検証する。

2) 細胞傷害活性およびアロ反応性の検証

本年はまた細胞傷害活性やアロ反応性を検

証する。このためには標的細胞 (EBV感染B細胞、ペプチドをパルスしたPHA刺激芽球、アロPHA刺激芽球) に⁵¹Crラベルし、用意した特異的T細胞と4時間培養し、上清に遊離した⁵¹Crを測定する。あるいは2で述べたような caspase 3の活性化を指標とした方法やCSFEパルスによる細胞分裂回数測定などを用いる。

(倫理的側面に対する配慮)

本研究では患者におけるウイルス測定や、健常人におけるHLA検査及びT細胞培養(採血)が実施される。これらについては倫理審査委員会の承認を得て、十分な説明と書類による同意取得のもとに実施される。

C. 結果

1. 日和見感染症モニタリング

造血細胞移植後、肝移植後、腎移植後のモニタリングシステムについて、測定すべきウイルスを抽出し、その測定系を再検証した。現時点では、肝臓移植分担者(水田)と腎臓移植分担者(服部)がそれぞれ施設倫理審査委員会に諮り、前向き研究及び cross sectionalな解析の両者を始めようとしているところである。現時点でのデータとしては、肝移植後のEBVやCMV感染症、腎移植後のCMV感染症が主体であるが、今後さらに測定ウイルスを拡大する。対象としているものとしては以下のものがあげられる。

通常セット:

HSV1, HSV2, VZV, EBV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8, BKV, JCV, Parvovirus B19, AdV, HIV1, HTLV1, HTLV2

・肝移植後で追加: HAV, HBV, HCV, HDV, HEV, HGV, TTV (腎移植では追加項目なし)

測定系については抽出から分注、検出に至るまでのstreamline化した測定系が確立しつつある。全自動化はQIAGEN QIA Symphonyで行うことが可能で、実証しているところである。加えて簡便な抽出方法、分注機器、リアルタイムPCRを用いた混成型自動化も検証している。

2. アロ反応検証系の確立

現時点で6名の健常人にてHLA タイピングを行い、それぞれに対してのアロ反応性をCFSE assayを用いて検証した。MLRでは反応の主体がClass IIのdisparityとなるため、今後もCFSE assayを中心に据えることを考えている。また4で調製した細胞を用いて、アロ反応性を検証するところであるが、まだCFSEアッセイの感度が低い。そこでPHA blastを標的とした⁵¹Cr遊離アッセイを用いて検討したところ、比較的良好な感度を得ることができた。今後は細胞傷害活性と細胞増殖測定系を組み合わせた検討を行う予定である。

3. EBV, CMV 特異的 T細胞の臨床研究

名古屋大学小児科においてEBV特異的T細胞、CMV特異的T細胞治療の臨床研究を継続した。具体的には移植後ATGを投与してEBV関連リンパ増殖症候群となり、また感染細胞がCD20陰性となってrituximabの効果が認められない症例に対して、EBV特異的T細胞調製を行い投与して、良好な結果を得ている。また本症例においては後にCMV感染症にも罹患し、同様にドナーからCMV特異的T細胞を用意して輸注して、本ウイルスの消失を認めた。一方GVHDを認めずその他の有害事象も認めなかった。現在、少数例の中で有効性と安全性が明らかになっているが、今後輸送系を確立することにより、広範囲な臨床研究としていく予定である。

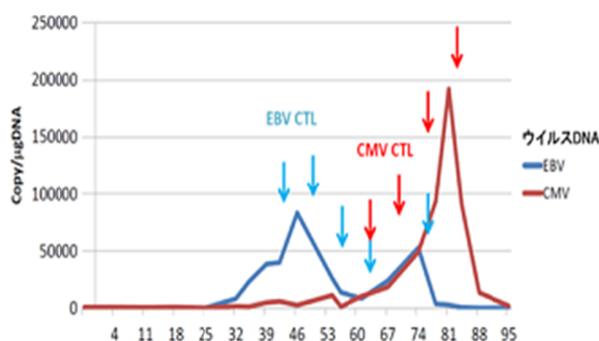


図1 移植後EBV-LPDに引き続き薬剤抵抗性CMV感染症を起こした患者へのEBV特異的T細胞治療→CMV特異的T細胞治療の効果

4.3 ウイルス特異的 T 細胞培養法の確立

EBV(LMP2, EBNA1, BZLF1), CMV(pp65, IE6), AdV(penton, hexon)の overlapping peptide を用いて刺激し、さらに IL-4, IL-7 で培養することにより(合計 12 日前後)特異的 T 細胞を得た。細胞は個別抄録が示すように CD3 が 95%以上であり、また CD4 が優位となる。現時点では 5 名にて解析しているが CD4/CD8 比率はドナーによっても大きく異なっている。大半の細胞は CD45RO+CD62L+CCR7+の central memory 分画にあり、一部が effector memory 分画であることが明らかになっている。それぞれの細胞は細胞内 IFN γ 染色および ELISPOT アッセイで特異的 T 細胞の存在が明らかになっており、合計するとほぼ 20-50%程度が特異的 T 細胞、一方その他が非特異的 T 細胞という結果であった。再刺激による特異的 T 細胞の増幅を様々な手法で試みているが、今のところ末梢血単核球(放射線処理あるいは MMC 処理)を用いるのがベストという結果を得ている。

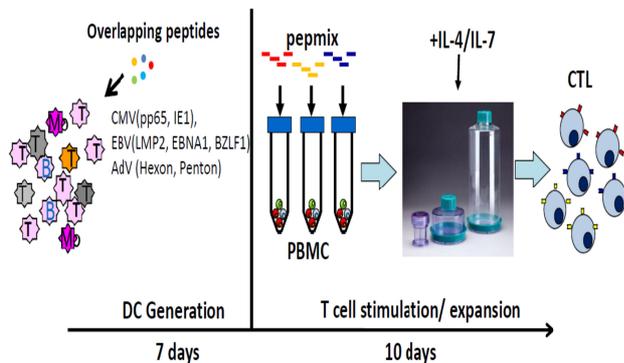


図2 3 ウイルス特異的 T 細胞培養系の概要

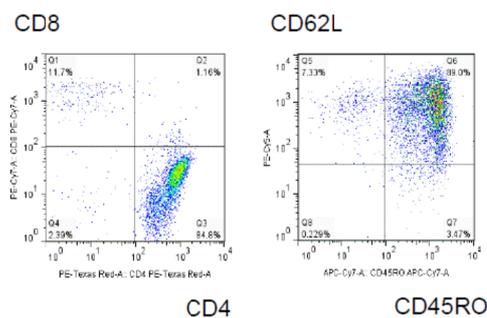


図3 調製した細胞の表面形質: CD45RO 陽性 CD62L 陽性の central memory が大半である。

さらにこれらの調製においては、無血清化を試みた。用いた無血清培地は KBM や TexMAX であり、現時点では血清フリーの状態での培養に成功している。また最終的な臨床応用を視野に入れ、IL-4, IL-7 濃度の至適化(低価格化の試み)及び培養容器の最適化(細胞調製施設での培養を鑑み 24 well plate から G-Rex システムへの移行)を行っており、ほぼ完成形が確立している。これらの細胞培養については手順を定め、標準作業手順書を作成している。

IFN- γ producing cells (pp65-CTL n=4)

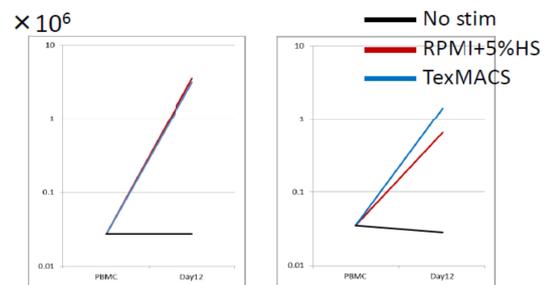


図4 無血清培地による培養: 血清入り培地と遜色のない増殖を示す。

基本的な部分の検討が終了するなか、細胞傷害活性検査の開発にもあたった。実際に最終的には 51Cr release assay で検討するが、非アイソトープ系の測定方法として、caspase 3 cleavage assay や蛍光色素を取り込ませ、その放出を感度良く検出する方法、Annexin V 染色による apoptosis 細胞の検出など様々な方策をとっているところである。51Cr release assay ではすでに peptide pulsed PHA blast を用いて、抗原特異的 CTL 活性を明らかにしつつある。一方アロ反応性は最小限(測定不可)であった。

本年度はまた HHV6(U90,U54), BKV(Large T, VP1)を加えた 5 ウイルス 11 抗原特異 T 細胞、JCV(Large T, VP1), VZV (IE62, IE63)を加えた 7 ウイルス 15 抗原特異的 T 細胞の調製も試み、すべての抗原に対して特異的な反応の誘導が可能であることを明らかにした。細胞の増殖も良好である。一方ペプチドの総種類が 1000 以上になることによるペプチド間の competition が生じることが懸念され、実際に単一ペプチド

刺激に比べて多ペプチド刺激では増殖(それぞれに対する最終特異的 T 細胞数)が劣る傾向にある。その問題を回避するために、加えるペプチドの絞り込みに向けて、それぞれの HLA に対するエピトープマッピングを開始した。

D . 考察

ウイルス検査系は完成の段階にあり、試薬化、キット化、自動化にむけて着実に歩みを進めている。そのような中、既に国外を中心に移植後のウイルス解析データが蓄積しており、今後一般的免疫能や、特異的免疫能と連動した形のウイルスモニタリングなどが必要となると考えている。

上記以外にこの研究班において本年度は、3 ウイルス特異的 T 細胞の樹立に注力した検討を行った。その結果、当初の目標を超えてより臨床応用に近い段階にまで達することができた。

しかし今後の課題としていくつかのことがあげられる。

1 つは価格である。サイトカインはオリジナルプロトコールでは IL-4 1,600IU/mL , IL-7 900IU/mL であり、費用を押し上げる要因となっている。この点については減量と至適化をはかっている。原材料費のみで一投与 2-3 万円程度までの価格低下を計りたい。2 つめは purity の問題である。ペプチドパルスした抗原提示細胞による再刺激が必須であり、その最適化が必要である。3 つめは CD4 細胞の比率が高いことであるが、本部分についてはおそらくペプチド長を 15 アミノ酸としている点が大きく効いているが、中庸な長さとして 15 mer は一般的には CD8 細胞の増幅にも用いられているものである。すでに Bayler 大学ではより短いもの、長いものでの検討が終了しており、CD8 陽性細胞の増幅のためには短いペプチドが有利であるが、その優劣については今後の検討課題としたい。4 つめは re-expansion の方法であり、これは 2 つめの課題と重複するが、現時点で 20mL 採血から得られる 10^8 オーダーの特異的 T 細胞は成人では 2-3 回投与分程度にあたる。再刺激によるさらなる増幅を目指したい。さらには実際に

特異的な CTL が得られたかどうかの検証には、HLA 拘束性についての検討が必要であり、現在 ELISPOT 法を用いた検討を開始しようとしているところである。最後に、多ウイルス特異的とした場合のペプチド間の競合による均等な増幅の阻害が問題になる可能性がある。この点についてはエピトープマッピングをストリームライン化して、少なくとも用いたドナーについては、HLA に応じたそれぞれの抗原に対するエピトープを明らかにし、最終的には最小限のペプチドプールにて刺激を行えるようにと考えている。

一方先行する 1 ウイルス特異的 CTL 療法については、輸送系の確立あるいは培養可能施設の拡大による、経験数の拡大が重要であり、輸送システムの確立と共に、臨床研究開始に向けては、経済的基盤の確立が必須の段階にある。

E . 結論

臓器移植後のウイルス感染症に対しては、ウイルス計測技術が確定しつつあり、測定すべきウイルスを決定し今年度内からデータが集積し始める段階にある。本年度は 3 ウイルス特異的 T 細胞の樹立方法をほぼ確立した。樹立した細胞についてはその性格を明らかにし、抗原特異的に細胞傷害活性があるという証左を得つつある。無血清化や IL-4, IL-7 の低濃度化、気密容器の使用など、現実的な対応策についても検討にはいり、ほぼ条件が確立しつつある。5 ウイルス特異的、7 ウイルス特異的 T 細胞培養にも着手しているが、3 ウイルス特異的 T 細胞調製については標準作業手順書も作成され、平成 26 年度内の臨床研究開始に向けての準備が整った。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

1 . 論文発表

巻末に記載の通り

2 . 学会発表

各分担研究者学会発表(G.2)参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

各分担研究者参照

2. 実用新案登録

各分担研究者参照

3. その他

各分担研究者参照

分担研究報告

**厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)
分担研究報告書**

移植後日和見モニタリングと3ウイルス特異的T細胞調製

研究代表者	森尾友宏	(東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科発生発達病態学分野 准教授)
研究協力者	藤田由利子	(東京大学医科学研究所 研究レジデント)
	小野 敏明	(東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科発生発達病態学分野 大学院生)
	熊木 恵里	(東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科発生発達病態学分野 大学院生)
	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分野 准教授)

研究要旨：

近年、同種造血幹細胞移植は移植前処置や補助療法などの発展により治療成績が良くなっている。特に移植後早期に細菌感染症により致命的となることが減少したことが移植治療の生存率改善に寄与していることは疑いようがない。反面、ウイルス感染症は抗ウイルス薬の種類も少なく、副作用も強いいため、移植後早期の免疫不全状態の場合には治療不十分であったり、移植後合併症により抗ウイルス薬が使用できないことも多い。

アメリカのベイラー医科大学の Leen らは抗原性の無い peptide を用いて簡便にサイトメガロウイルス、EBウイルス、アデノウイルスの3ウイルス特異的T細胞を作成し、造血幹細胞移植後の感染症患者に投与している。我々は Leen らの指導のもと、造血幹細胞移植後に問題となる7ウイルス(サイトメガロウイルス(CMV)、EBウイルス(EBV)、アデノウイルス(AdV)、BKウイルス、JCウイルス、ヒトヘルペスウイルス-6(HHV-6)、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV))特異的T細胞を作成し、造血幹細胞移植後の感染症患者に投与することを研究する。

ベイラー医科大学と同じように抗原性の無い peptide を用いるが、我々はより臨床に使用しやすいように血清を用いない培地での作成を研究する。血清を入れないことにより、感染症や副反応を減らせることが期待できる。

A . 研究目的

- 1 . 本年度は臓器移植後・造血細胞移植(SCT)後日和見感染モニタリングに用いるウイルスを肝移植専門医(水田耕一先生)、腎移植専門医(服部元史先生)と策定し、検査系を確立し実用化することを目的とした。
- 2 . 7ウイルス 15 抗原特異的T細胞調製についての基礎検討を行い、実際に調製が可

能であることを検証すること、さらにその表面抗原特性や産生する生理活性物質を詳細に検討すること、また細胞傷害活性を明らかにすることを目的とした。

B . 方法

- 1 . 難治疾患研究所ウイルス治療学分野清水則夫先生の支援を受けて、96 well プレートを用いて、必要試薬を固相化して、サ

サンプルを一定量混入してリアルタイム PCR を行える系を作成し検証した。

2. 健常人ボランティアから末梢血単核球を分離し、11 アミノ酸ずつ overlap した 15 アミノ酸長のペプチド混合物を、

EBV(LMP2, EBNA1, BZLF1), CMV(pp65, IE1), AdV(penton, hexon), BKV(LargeT, VP1), JCV(LargeT, VP1), HHV6(u54, u90),

VZV(IE62, IE63)に対して用意し、IL-4, IL-7 存在下に 9-12 日間培養を行った。この際に

1) 血清添加(RPMI1640[®]にウシ血清を添加)あるいは無添加(TexMACS[®])、2) ガス透過性培養容器(G-Rex[®])にて培養した場合と、

24 穴プレートおよび通常のフラスコにて培養した場合の差異を検討し、また 3) IL-4, IL-7 の濃度を替えて最低量のサイトカイン量を明らかにした。4) また特異的細胞傷害活性については、⁵¹Cr 遊離試験および

caspase 3 測定 (flowcytometry 法)にて解析し、同様の手法を用いてアロ反応性を検証した。標的細胞として EBV は LCL も用いたが、他のウイルスに関しては感染細胞を容易に入手できないため、Leen らの手法を参考にして PHA-blast を作成し、それにウイルス特異的 T 細胞を作製した時と同じ peptide で刺激して疑似的な感染細胞とした。

アロ反応性に関しても Leen らに倣い、別の健常人ドナー(HLA 検査済み)から採取した末梢血から PHA-blast を作成し標的細胞として使用した。caspase-3 測定では、標的細胞を Cell Tracker Violet[®](CTV)にて標識しウイルス特異的 T 細胞と共培養。

flowcytometry 法にて CTV 陽性細胞の中で caspase-3 陽性細胞を評価した。

(倫理的側面に対する配慮)

本研究ではヒト検体を扱い、また健常者から 20-50mL 程度の採血を行う。研究に関しては東京医科歯科大学及び東京大学医科学研究所倫理審査委員会の承認を得て行った。また採血や検査に際しては十分な説明のもと、被験者の同意を得て実施する。

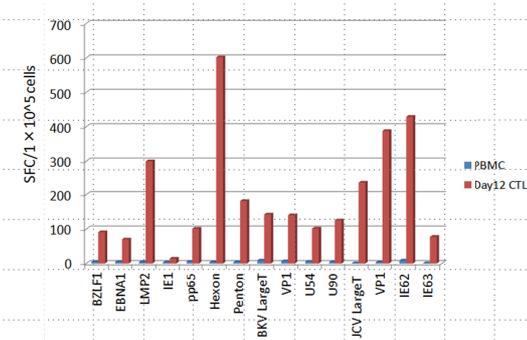
C. 結果

1. HSV1, HSV2, VZV, EBV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8, BKV, JCV, Parvovirus B19, AdV, HIV1, HTLV1, HTLV2 および HAV, HBV, HCV, HDV, HEV, HGV, TTV を測定する系を確立し、それぞれが 10 copies/sample を解析できることを明らかにした。これを用いて肝移植、腎移植後の患者検体を測定する準備を開始した。

2. EBV, CMV, AdV, BKV, JCV, HHV-6, VZV 7 ウイルス 15 抗原特異的 T 細胞培養実験により、合計 20-50%がペプチド刺激後 IFN- γ 産生能を有する特異的 T 細胞を調製することができた。>95%が CD3 陽性の T 細胞であり、CD4 が優位である場合が多かった。T 細胞は CD45RO+CD62L+CCR7+の central memory が主体で、一部 CD62L-の effector memory であった。

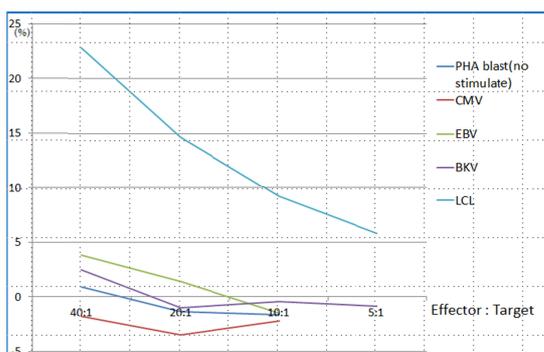
ウイルス特異的 T 細胞が産生する IFN- γ を ELLISpot 法と flowcytometry 法にて解析したが、末梢血単核球の状態より強い産生能を確認できた。Flowcytometry 法にてそれほど強い反応を認めなくても、ELLISpot 法では十分に産生しているものも認めた。ELLISpot 法の検討では末梢血単核球の状態より 10 倍から 1,000 倍になっていた。

以下にあるドナーから作成した ELLISpot 法の結果の 1 例を示す。

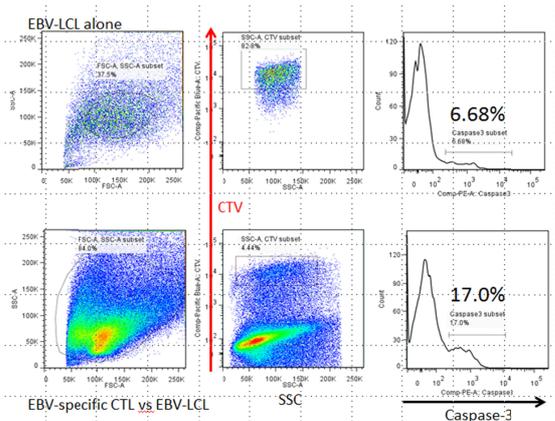


我々の作成したウイルス特異的 T 細胞では CD4+細胞が多いため、細胞傷害活性を持たない可能性も懸念されたが、⁵¹Cr release assay や caspase-3 cleavage assay では作成した細胞の細胞傷害活性が証明された。以下

に 51Cr release assay の結果の 1 例を示す。標的細胞はドナーから別の機会に採取した末梢血より作成した PHA-blast で、PHA-blast に peptide 刺激を加えたものである。



以下に caspase-3 cleavage assay の結果の 1 例を示す。標的細胞は LCL で、CTV にて標識し、ほぼすべての LCL が CTV にて標識されていることを確認。CTV 陽性細胞の集団で caspase-3 を検討したが、ウイルス特異的 T 細胞を共培養させた場合有意に caspase-3 の増加を確認できた。



作成時に添加する IL-4 と IL-7 は一つの peptide 刺激であれば非常に少ない量でも問題なさそうであったが、15 種の peptide では競合し、増殖しにくくなると考えられた。細胞調製の安定性に配慮し、Leen らの報告している IL-4 を半分の量にするにとどめたが、問題なく作成できることを確認した。また、ガス透過性細胞容器はこれまで使用

してきた 24 穴プレートと通常のフラスコ使用時と遜色なく培養できることを確認した。

D . 考察

ウイルス測定系については今後 protocol の最終版を確定して、prospective および cross sectional な解析に入りたい。ウイルス特異的 T 細胞調製に関しては、まだ purity の問題があり、今後再刺激による増幅と高純度化を目指す必要がある。無血清化にあたっては、培地交換等の至適化が必要となっており、さらに細かい調製手順の策定が必要である。

E . 結論

本年度は、3 ウイルス 7 抗原特異的 T 細胞調製の実用化を目指した詳細な検討が進み、細胞の characterization、培養条件の最適化が行われた。一方ウイルス測定系も完成段階に達し、移植関連施設の検体を受け入れる体制が整った。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Nagasawa M, Ohkawa T, Endo A, Mitsui N, Ono T, Aoki Y, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Kajiwara M, **Morio T**, Mizutani S. Early coagulation disorder after allogeneic stem cell transplantation is a strong prognostic factor for transplantation-related mortality, and intervention with recombinant human thrombomodulin improves the outcome: a single-center experience. *Int J Hematol*. **98**: 533-42, 2013.
2. Kumaki S, Sasahara Y, Kamachi Y, Muramatsu H, **Morio T**, Goi K, Sugita K, Urabe T, Takada H, Kojima S, Tsuchiya S, Hara T. B-cell function after unrelated

umbilical cord blood transplantation using a minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID. *Int J Hematol.* **98**: 355-60, 2013.

3. 渡辺恵理、阿部素子、工藤寿子、浜田聡、糸洲倫江、中内啓光、**森尾友宏**、渡辺信和:重症複合免疫不全症に対する臍帯血ミニ移植後の混合キメラリズムの遷延 **CYTOMETRY RESEARCH** **23**: 41-9, 2013.
4. **森尾友宏**:インフルエンザに対する自然及び獲得免疫応答 **小児内科** **45**:1947-51, 2013.
5. **森尾友宏**、宮坂あかね、小野敏明、落合央、藤田由利子、高橋聡:移植後ウイルス感染に対する多ウイルス特異的 CTL 療法、**日本小児血液がん学会雑誌** **50**:335-40, 2013.
6. **森尾友宏**:間葉系幹胞による移植片対宿主病の治療 **臨床免疫・アレルギー科** **60**: 210-7, 2013.

2. 学会発表

1. **Morio T.** Cord blood transplantation for

primary immunodeficiency in Japan.

AsiaCORD2013. Kobe, Japan. April 2013.

2. **森尾友宏**、小野敏明、高島健浩、満生紀子、高木正稔、今井耕輔、水谷修紀、落合央、清水則夫、藤田由利子、高橋聡、立川愛、高橋義行、Ann M Leen, Malcolm Brenner:オーバーラッピングペプチドを用いた多ウイルス特異的 T 細胞の調製. **第 7 回日本免疫不全症研究会**, 福岡, 2014 年 1 月
3. **森尾友宏**:造血細胞移植後のウイルス感染症. **第 43 回東海小児造血細胞移植研究会(招待講演)**, 名古屋, 2013 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)
分担研究報告書

3 ウイルス特異的T細胞調製:細胞傷害能の検証と臨床応用に向けた書類整備

研究分担者 高橋 聡 (東京大学医科学研究所先端医療研究センター分子療法分野
准教授)
研究協力者 藤田由利子 (東京大学医科学研究所 研究レジデント)
小野 敏明 (東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科発生発達病態学分野
大学院生)

研究要旨:

臨床応用に向けて製品標準書及び製造及び品質管理にかかわる書類を作成した。また製品標準書の1項目として加える可能性のある細胞傷害活性については、放射性同位元素を用いる従来法以外に、1日以内に簡便に判定できる系を立ち上げ、検証した。

A. 研究目的

3 ウイルス7抗原特異的T細胞の実用化に向けた研究代表者と連動して、より簡便な細胞傷害活性測定系の確立、実投与に向かったの培養の最適化、標準作業手順書の策定を目的とした。

B. 方法

1. 3 ウイルス7抗原特異的T細胞を overlapping peptides と IL-4, IL-7 を用いて作成した。これらを用いて、細胞傷害活性を測定した。方法としては通常用いられる 51Cr ラベル法、cleaved caspase 3 を抗体で検出する方法、PhiPhiLux を用いて caspase 3 に切断されると蛍光を発することを指標に FACS で検出する方法、細胞内に色素を取り込ませ apoptosis を起こした細胞から溶出する色素を測定する方法、Annexin V/7AAD 染色を行う方法などを検討した。

2. 研究代表者による培養結果などをもとに、標準作業手順書の策定にあたった。

C. 結果

1. 標的細胞としては EBV-LCL を除き感染細胞が得られないために、PHA-blast にペプチドをパルスしたものをを用いた。51Cr release assay においては、Effector/target ratio 5:1 にて 40% 程度の killing が認められることが明らかになった。さらに研究代表者が中心に実施している 51Cr release assay に加えていくつかの方法を試みた。細胞傷害活性の検出には Annexin V/7AAD 染色により Annexin V 分画を検出する方法、及び cleaved caspase 3 を検出する方法が有用である。共に標的細胞は cell tracker violet で染色して FACS 上で gating できる状態として、用意した effector 細胞と混じることにより、apoptosis を起こした標的細胞を捕まえることができた。具体的にはアデノウイルス特異的 T 細胞では 3-5% 程度の明らかな細胞傷害活性が検出され、また同様に IFN-gamma 産生も十分であることが検証できている。

2. 標準作業手順書は東京医科歯科大学医学部附属病院細胞治療センターが再生医療・細胞治療用に作成しているものを雛形として、製造指図兼記録書を用意すると共に、製品標準書草案を作成した。製品規格の部分での

purity や、細胞調製段階における培地やサイトカイン量、また GMP 規格のサイトカインを使用するかどうかなど詰めるべき点が残されている。

D . 考察

1 . 細胞傷害性アッセイについてはいくつかの方法を検証することにより、⁵¹Cr release assay を基軸に、様々な non-radiolabel 法を用いた鋭敏な方策も用いられることが明らかになった。今後の課題としては真の標的細胞の利用、及び CD4 が主体となった特異的 T 細胞での細胞傷害活性測定法の最適化がある。後者ではより長い incubation 時間が必要になる可能性がある。前者ではまた、時に細胞傷害活性が十分とならない場合があり、CD107 染色などを加えた検討が必要となる可能性がある。

2 . 標準作業手順書に関しては今後の再生医療新法及びその省令に要求されると予想されるものを網羅し、また 6 学会研究会合同免疫細胞培養ガイドラインの規格を満たしたものを作成した。今後さらに時期に応じて brush up が必要である。

E . 結論

3 ウイルス 7 抗原特異的 T 細胞の細胞傷害活性を、いくつかの方法を用い、開発しながら検証した。また今後の臨床応用 (臨床研究) に向けて必須な標準作業手順書の草案を作成した。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

1 . 論文発表

1. Atsuta Y, Suzuki R, Yamashita T, Fukuda T, Miyamura K, Taniguchi S, Iida H, Uchida T, Ikegame K, **Takahashi S**, Kato K, Kawa K, Nagamura-Inoue T, Morishima Y, Sakamaki H, Kodera Y. Continuing increased risk of oral/esophageal cancer after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults in association with chronic

graft-versus-host disease. *Ann Oncol.* **25** : 435-41, 2014.

2. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaru K, Tojo A, **Takahashi S**. Effect of ABO Blood Group Incompatibility on the Outcome of Single-Unit Cord Blood Transplantation after Myeloablative Conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant.* [Epub ahead of print] 2013.
3. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaru K, Asano S, Tojo A, **Takahashi S**. Single-Unit Cord Blood Transplantation after Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Combined Myeloablative Conditioning for Myeloid Malignancies Not in Remission. *Biol Blood Marrow Transplant.* [Epub ahead of print] 2013.
4. Konuma T, Kato S, Oiwa-Monna M, Tojo A, **Takahashi S**. Pretransplant hyperferritinemia has no effect on the outcome of myeloablative cord blood transplantation for acute leukemia and myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol.* [Epub ahead of print] 2013.
5. Tanaka J, Morishima Y, Takahashi Y, Yabe T, Oba K, **Takahashi S**, Taniguchi S, Ogawa H, Onishi Y, Miyamura K, Kanamori H, Aotsuka N, Kato K, Kato S, Atsuta Y, Kanda Y. Effects of KIR ligand incompatibility on clinical outcomes of umbilical cord blood transplantation without ATG for acute leukemia in complete remission. *Blood Cancer J.* **3**: e164, 2013.
6. Nishiwaki S, Miyamura K, Ohashi K, Kurokawa M, Taniguchi S, Fukuda T, Ikegame K, **Takahashi S**, Mori T, Imai K, Iida H, Hidaka M, Sakamaki H, Morishima Y, Kato K, Suzuki R, Tanaka J. Impact of a donor source on adult Philadelphia chromosome-negative acute

- lymphoblastic leukemia: a retrospective analysis from the Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Ann Oncol.* **24** : 1594-602, 2013.
7. Mae H, Ooi J, **Takahashi S**, Kato S, Kawakita T, Ebihara Y, Tsuji K, Nagamura F, Echizen H, Tojo A. Acute kidney injury after myeloablative cord blood transplantation in adults: the efficacy of strict monitoring of vancomycin serum trough concentrations. *Transpl Infect Dis.* **15** : 181-6, 2013.
 8. Mori T, Tanaka M, Kobayashi T, Ohashi K, Fujisawa S, Yokota A, Fujita H, Nakaseko C, Sakura T, Nannya Y, **Takahashi S**, Kanamori H, Kanda Y, Sakamaki H, Okamoto S. Prospective multicenter study of single-unit cord blood transplantation with myeloablative conditioning for adult patients with high-risk hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant.* **19** : 486-91, 2013.
 9. Ebihara Y, Yamamoto S, Mochizuki S, Tsukada M, Taya Y, Kawakita T, Kato S, Ooi J, **Takahashi S**, Tojo A, Tsuji K. Pneumothorax in an early phase after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Hematol Rep.* **5** : 34-5, 2013.
 10. Yamamoto S, Ebihara Y, Mochizuki S, Kawakita T, Kato S, Ooi J, **Takahashi S**, Tojo A, Yusa N, Furukawa Y, Oyaizu N, Watanabe J, Sato K, Kimura F, Tsuji K. Quantitative polymerase chain reaction detection of CEP110-FGFR1 fusion gene in a patient with 8p11 myeloproliferative syndrome. *Leuk Lymphoma.* **54** : 2068-9, 2013.
 11. Morimoto A, Shimazaki C, **Takahashi S**, Yoshikawa K, Nishimura R, Wakita H, Kobayashi Y, Kanegane H, Tojo A, Imamura T, Imashuku S. Therapeutic outcome of multifocal Langerhans cell histiocytosis in adults treated with the Special C regimen formulated by the Japan LCH Study Group. *Int J Hematol.* **97** : 103-8, 2013.
 12. Doki N, Miyawaki S, Tanaka M, Kudo D, Wake A, Oshima K, Fujita H, Uehara T, Hyo R, Mori T, **Takahashi S**, Okamoto S, Sakamaki H. Visceral varicella zoster virus infection after allogeneic stem cell transplantation. Kanto Study Group for Cell Therapy. *Transpl Infect Dis.* **15** : 314-8, 2013.

H . 知的財産権の出願・登録状況

- 1 . 特許取得
なし
- 2 . 実用新案登録
なし
- 3 . その他
なし

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)
分担研究報告書

ウイルス抗原特異的細胞傷害性T細胞による造血幹細胞移植後の
難治性感染症の治療

研究分担者 高橋義行 (名古屋大学大学院医学系研究科成長発達医学 准教授)

研究要旨：

ウイルス抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) による臨床第 1 相試験を行った。造血細胞移植の HLA - A2 または A24 陽性ドナー末梢血よりサイトメガロウイルス (CMV)、EB ウイルス (EBV) に対する特異的 CTL を誘導した。CMV 特異的 CTL の投与を 5 名で行った。投与後の発熱、発疹などの急性反応はなく、1 例で GradeIII の肝障害を認めたが無治療で速やかに改善した。他に重篤な合併症も認めなかった。4 名の患者で投与後末梢血から CMV - DNA の低下、消失を認めた。リツキシマブ無効の移植後 CD20 陰性 EBV-LPD に対して EBV 特異的 CTL 療法を行い、ウイルス血症、PET/CT での腫瘤取り込みは消失した。

A . 研究目的

造血幹細胞移植後の患者における難治性ウイルス特異的 CTL の体外増幅法を開発し、移植後の難治性ウイルス感染症に対して臨床第 1、2 相試験を行う。

B . 研究方法

造血細胞移植 HLA-A2 または A24 陽性ドナーの末梢血 30ml から単核球を分離し、ウイルス特異的ペプチドで刺激後、IL-2 添加培地で 1 週間培養し、その後我々の開発した方法に基づき CD3 で刺激した T 細胞に抗原ペプチドをパルスしたものを抗原提示細胞とし T 細胞に加え閉鎖的培養無菌バッグにより培養した。初回投与細胞数、 $1 \times 10^5 / \text{kg}$ より漸増し、計 3 回の投与を行い、投与前後の末梢血ウイルス DNA の評価を行う。

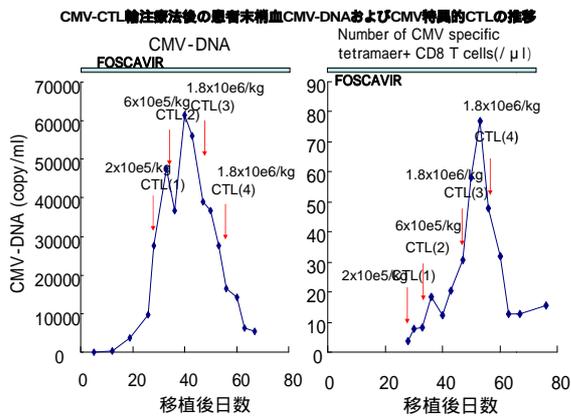
(倫理的側面に対する配慮)

本研究は名古屋大学医学部バイオ先端臨床研究審査委員会の承認後、ドナーから文書による同意を得ておこなう。

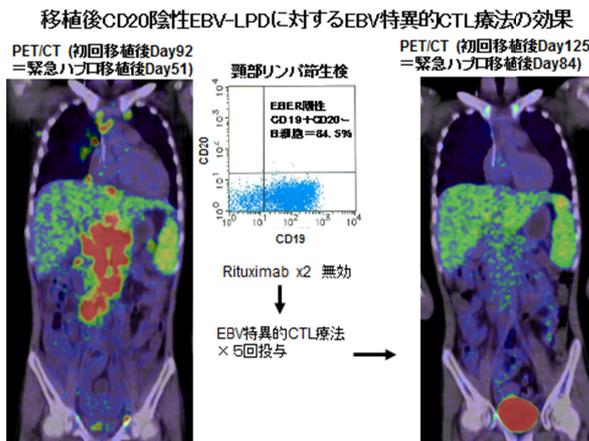
C . 研究結果

造血細胞移植の HLA - A2 または A24 陽性ドナー末梢血よりサイトメガロウイルス (CMV)、EB ウイルス (EBV) に対する CTL を誘導した。培養はこれまでに CMV が 12 名、EBV が 17 名で行い、それぞれ 7 名、7 名で初回投与基準を満たす細胞数の増殖が得られた。うち培養上清中に含まれるウイルス検査の基準も満たしたのは、6 名、3 名であった。

GCV 耐性 CMV 感染を起こした患者 5 名 (うち本年度は 2 例) に対し CMV-CTL の投与を行った。いずれも投与後の発熱、発疹などの急性反応はなく、他に重篤な合併症も認めなかった。1 例で GradeIII の肝障害を認めたが無治療で速やかに改善した。5 例中 4 例の患者で投与後末梢血からの CMV - DNA の低下、消失を認めた。CTL 投与後の CMV-DNA の消失および患者体内での CMV-CTL の増加を示す (下図)



また、リツキシマブ無効の移植後 CD20 陰性 EBV-LPD に対して EBV 特異的 CTL 療法を行い、ウイルス血症、PET/CT での腫瘍取り込みは消失した。(下図)



D. 考察

骨髓移植ドナーから 3-4 週間の培養期間で CMV または EBV 特異的 CTL を臨床応用可能なレベルまで培養増幅することができた。

当院倫理委員会での承認後、臨床第1,2相試験が開始された。5名の投与はいずれも安全に投与でき、うち4名で効果が見られた。培養に 3-4週間かかること、投与基準をみたら CTL が得られるのは CMV 特異的 CTL で約 50%、EBV 特異的 CTL では約 30% であることから、EBV 特異的 CTL の誘導ペプチドの追加など培養法の改善が必要と考えられ、またリスクの高い移植患者ではあらかじめドナーより培養し凍結しておくか、第三者からウイルス特異的

CTL を培養し保存しておく CTL バンクの作成、運用が望ましいと考えられた。

E. 結論

臨床第1相試験が開始された。まだ投与例が少なく、今後さらに CTL 培養条件を改善し、症例数を増やす必要があるものの、いずれも安全に投与可能であり、明らかな効果の見られた症例も認められた。厚労省へ本治療法に関する先進医療への方向性についてご相談し、臨床第2相試験については第三者からの CTL 療法を行うよう指導をうけ、現在準備中である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kato K, Otake H, Tagaya M, **Takahashi Y**, Ito Y, Hama A, Muramatsu H, Kojima S, Naganawa S, Nakashima T. Progressive hearing loss following acquired cytomegalovirus infection in an immunocompromised child. *Am J Otolaryngol.* **34** : 89-92, 2013 .
- Takahashi Y**, Muramatsu H, Sakata N, Hyakuna N, Hamamoto K, Kobayashi R, Ito E, Yagasaki H, Ohara A, Kikuchi A, Morimoto A, Yabe H, Kudo K, Watanabe K, Ohga S, Kojima S. Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic anemia. *Blood.* **121** : 862-3, 2013.

2. 学会発表

- 高橋義行**：骨髓由来間葉系幹細胞、ウイルス特異的 CTL を用いた造血幹細胞移植療法の改善. **第21回信州先端血液研究会**、松本、2013年2月
- 高橋義行**：移植後難治性サイトメガロウイルス感染に対するウイルス抗原特

- 異的細胞障害性T細胞（CTL）療法、ワークショップ、**第35回日本造血細胞移植学会**、金沢、2013年3月
3. **高橋義行**、川島希、成田敦他：ドナー由来ウイルス特異的CTLおよび間葉系幹細胞を準備したHLAハプロ一致移植。**第75回日本血液学会** 札幌、2013年10月
4. **Takahashi Y**, Kawashima N, Narita A, Sakaguchi H, Muramatsu H, Hama A, Kojima S. Unmanipulated HLA Haploidentical Bone Marrow Transplantation Combined With PBSC with the Options of Donor Virus Specific CTLs and Mesenchymal Stem Cells

Infusion.

55th American Society Hematology annual meeting. New Orleans, USA. Dec 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)
分担研究報告書

ウイルス特異的 T 細胞療法における標的部位の同定と HLA 拘束性に関する研究

研究分担者 立川 愛 (東京大学医科学研究所 准教授)

研究要旨：

多ウイルス特異的 T 細胞療法の臨床応用に向けて、オーバーラップペプチドで刺激培養されたウイルス特異的 T 細胞の評価系を構築するため、エピトープマッピング法について検討を行った。3 ウイルス 7 抗原でのエピトープマッピングは実現可能であることが示唆された。

A . 研究目的

移植医療は、適切な移植源選択や免疫抑制剤の使用等により、奏功率は向上している。しかしながら、移植後に不可避である免疫抑制状態でのウイルス感染症は、未だ患者の生命予後を脅かす大きな問題となっている。健常人では重篤な症状を呈することが稀なサイトメガロウイルス(CMV)、Epstein-Barrウイルス(EBV)、アデノウイルス(AdV)等の感染症が、移植後患者においては致命的な感染症となる。このようなウイルス感染症の多くは有効な治療法が存在しないか、あるいは副作用、費用対効果等の問題点があり、抗ウイルス薬以外の治療法に頼らざるを得ないのが現状である。

抗原特異的細胞傷害性T細胞(CTL)は、我々の持つ免疫応答の中でも、特にウイルス感染細胞の排除を行うことでウイルス感染コントロールに寄与している重要な免疫監視機構である。近年、移植後CMV, EBV, AdV感染症に対して試験管内で増幅したドナーあるいはアロ由来のウイルス特異的CTLを用いた免疫療法が行われる様になり、劇的な成果を挙げている。従来では、特定のエピトープに対するCTLを試験管内で増幅しているが、この方法ではHLA型やエピトープ情報が明らかとなっている抗原についてしか施行することができず、一部の患者に対してのみしか適応がない。本研究班ではこの問題点を克服する

べく、多ウイルス特異的T細胞を網羅的に増幅し、いかなるHLA型にも対応可能な免疫療法の開発を行っている。この方法では、複数のウイルスタンパク質全体をカバーするオーバーラップペプチド(OLP)プールを抗原としてT細胞を増幅培養するため、HLA型によらず多種多様なウイルス特異的T細胞を網羅的に誘導することが可能である。

新規治療法開発の臨床研究においては、治療効果の評価が重要であり、多ウイルス特異的T細胞療法を実臨床へ導入するためには、増幅した抗原特異的T細胞の質の評価系を構築する必要がある。具体的には増幅された抗原特異的T細胞の標的部位と、そのHLA拘束性を明らかにし(エピトープマッピング)、それぞれのエピトープ特異的T細胞を定量することであり、細胞療法で全般的に問題となるコンタミネーション等のチェックに加え、品質管理として重要であると考ええる。

エピトープマッピングの際、まず反応性のあるOLPを決定していくことが必要であるが、細胞数に制約があるため、全てのOLPについて個々の反応性を調べることは不可能である。私は、これまでにHIVのGagタンパク質について、OLPマトリックスを構築し、HIV感染者の末梢血単核球を用いて、少数の細胞でのエピトープマッピングに成功している。本研究では、これまでの手技、知見を応用し、多ウイ

ルス特異的T細胞療法における増幅されたウイルス抗原特異的T細胞の評価系の確立を目指し、効率の良いエピトープマッピング法を検討する。

B．研究方法

本研究班で第二世代と位置づけている、3ウイルス特異的T細胞療法の対象とする7種類のウイルスタンパク質 (CMV:pp65, IE1, EBV:EBNA1, LMP2, BZLF1, AdV:Penton, Hexon) について検討した。OLPは、T細胞培養時に抗原として使用しているのと同じの11アミノ酸オーバーラップ、15アミノ酸長のOLPを用いることとした。

C．研究結果

<OLPマトリックスを用いたエピトープマッピングの原理>

100種類のOLPを用いたマトリックスを例に挙げる(図)。10x10の方陣を用いて、縦のプール(A-J)と横のプール(1-10)、計20プールを作成する。それぞれのプールを抗原とし、T細胞応答をIFN- γ ELISpot assayにて解析する。プールAとプール1に反応が見られた場合、OLP1が反応を示すOLPであることを特定できる。一方、図の様にプールA,F、プール1,7に反応が見られた場合、OLP1,6,61,66の4種類が候補となり、そのうち2つが真の反応性OLPである。候補となった4種類のOLPに対して個々に反応性を確認し、真の反応性OLPを決定する。

マトリックスの構築では、方陣の一辺の数を大きくすればするほど、少ないプールでのマッピングが可能である。しかしながら、1つのプールに複数の反応性OLPを混在した場合、個々のOLPを用いての反応性OLPの同定に多くの細胞が必要となる。本研究では15x15の方陣を用いてマトリックスを構築する事とした。

<3ウイルス7タンパク質をカバーするOLPでのマトリックスの構築>

CMV-pp65, CMV-IE1, EBV-EBNA1, EBV-LMP2, EBV-BZLF1, AdV-Penton,

AdV-Hexonはそれぞれ561, 491, 641, 497, 245, 571, 944アミノ酸からなる。これらのタンパク質をカバーする11アミノ酸オーバーラップ、15アミノ酸長のOLPの数は合計で973種類になる。しかしながら、EBV-EBNA1には、グリシンとアラニンからなる繰り返し配列が約420アミノ酸にわたって存在するため、同一配列となるOLPを除いた結果、954種類のOLPにより網羅されることがわかった。15x15方陣を用いた場合、136のプールで全てをカバーすることができ、96wellプレート1.5枚で判定できる。細胞数としては、末梢血単核球が 1.5×10^7 個あれば十分に判定可能であると考えられた。

D．考察

OLPマトリックスを構築することで、少数の細胞で3ウイルス7抗原におけるエピトープマッピングが可能であることがわかった。次年度以降、健常人ボランティアの協力を得て本法の有用性を明らかにし、抗原特異的T細胞療法の臨床応用に向けて評価系を確立する。

欧米ではこれらのウイルスのエピトープは数多く報告されておりデータが蓄積しているが、日本人とはHLA型が大きく異なっているため、日本人集団におけるエピトープ情報としては不十分である。本研究では反応性OLPを決定すると同時に、HLAタイピングも行い、反応性OLP内に存在するエピトープとそのHLA拘束性を明らかにする予定である。本研究では移植後ウイルス感染症として問題となるウイルスについて、日本人集団におけるエピトープデータベースの構築も目指したい。

E．結論

多ウイルス特異的T細胞療法の臨床応用に向けて、試験管内で樹立されたウイルス特異的T細胞の評価系の構築を目指し、エピトープマッピング法を検討した。10mL程度の採血で、7抗原について解析可能であることがわかった。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Shimizu A, **Kawana-Tachikawa A**, Yamagata A, Han C, Zhu D, Sato Y, Nakamura H, Koibuchi T, Carlson J, Martin E, Brumme CJ, Shi Y, Gao GF, Brumme ZL, Fukai S, Iwamoto A. Structure of TCR and antigen complexes at an immunodominant CTL epitope in HIV-1 infection. *Sci Rep.* **3** : 3097, 2013
2. Teeranaipong P, Hosoya N, **Kawana-Tachikawa A**, Fujii T, Koibuchi T, Nakamura H, Koga M, Kondo N, Gao GF, Hoshino H, Matsuda Z, Iwamoto A. Development of a rapid cell-fusion-based phenotypic HIV-1 tropism assay. *J Int AIDS Soc.* **16** : 18723, 2013.

2. 学会発表

1. Nakayama-Hosoya K, Ishida T, Hosoya N, Nakamura H, Koga M, Koibuchi T, Iwamoto A, **Kawana-Tachikawa A**. Low IL-2 expression by epigenetic modification is associated with immunosenescence in HIV non-controllers. **Keystone symposia, HIV Pathogenesis – Virus vs Host**. Banff, Alberta, Canada. Mar 2014.
2. Meribe S, Hasan Z, Gatanaga H, Miura T, **Kawana-Tachikawa A**, Iwamoto A, Oka S, Ueno T. Linkage between disease status and a naturally-arising mutation in functional region of HIV-1 Nef. **21th conference on retroviruses and opportunistic infections**. Boston, USA. Mar 2014.
3. **Kawana-Tachikawa A**. Pathogenesis, Gene regulation, and signal transduction. “Interaction between virus and host immune response during chronic HIV-1 infection”.

The 9th China-Japan Laboratory

Workshop. Beijing, China. Nov 2013.

4. Nakayama-Hosoya K, Ishida T, Hosoya N, Nakamura H, Koga M, Koibuchi T, Iwamoto A, **Kawana-Tachikawa A**. The essential role of epigenetic regulation for CD4+ T cell dysfunction during chronic HIV-1 infection. **AIDS Vaccine 2013 Conference**. Barcelona, Spain. Oct 2013.
5. Meribe S, **Kawana-Tachikawa A**, Ueno T. Naturally arising amino-acid polymorphisms within functional regionsof HIV-1 Nef influence viral persistence in vivo. **第42回日本免疫学会学術集会、千葉、2013年12月**
6. 石坂彩、**立川(川名) 愛**、中村仁美、古賀道子、細谷紀彰、鯉淵智彦、野本明男、岩本愛吉、水谷荘利：HIV-1 陽性者末梢血からの HIV-1 短鎖 RNA の検出および定量法の確立。 **第27回日本エイズ学会学術集会、熊本、2013年11月**
7. **立川(川名) 愛**、韓忠勇、清水晃尚、細谷紀彰、中村仁美、古賀道子、鯉淵智彦、いわ本愛吉：重複する CTL エピトープ部位に生じた1アミノ酸変異によるエピトープの消滅と出現。 **第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月**
8. **立川(川名) 愛**：HIV感染症に対する免疫細胞療法の可能性。 **第5回造血器腫瘍免疫療法研究会、名古屋、2013年7月**

H . 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得

なし

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし

		プールA					プールF				
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
プール1	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	2	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	3	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	4	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	5	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
	6	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
プール7	7	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
	8	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
	9	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
	10	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

図：OLPマトリックスの構築

**厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)
分担研究報告書**

小児腎移植患者の腎移植後日和見ウイルス感染症の実態に関する検討

研究分担者 服部元史 (東京女子医科大学腎臓小児科 教授)

研究要旨：

腎移植後日和見ウイルス感染症は、患者の生命予後のみならず移植腎機能予後を左右する重大な合併症である。小児腎移植患者の腎移植後日和見ウイルス感染症の実態を把握する目的で、2010年1月から2013年12月までの期間中に自施設で腎移植を実施した56例を後方視的に検討した。その結果、サイトメガロウイルス(CMV)感染症1例、ポリオマウイルスBK(BKV)腎症2例、水痘2例、単純ヘルペスウイルス(HSV)1型2例、そしてアデノウイルス(ADV)による出血性膀胱炎1例と、約14%の小児腎移植患者において腎移植後日和見感染症が発症した。また、CMVとEpstein-Barrウイルス(EBV)に関して、ドナー(D)+/レシピエント(R)-の組み合わせの腎移植の割合は、CMVは30.4%、EBVは26.1%であった。このように、小児腎移植患者は移植後日和見ウイルス感染症を起こすリスクが高いため、移植後日和見ウイルス感染症に対する効果的なモニタリング方法の確立とウイルス特異的T細胞療法などの新たな治療法の開発・臨床応用が必要である。キーワード:小児/腎移植/移植後日和見ウイルス感染症

A . 研究目的

腎移植後日和見ウイルス感染症は、患者の生命予後のみならず移植腎機能予後を左右する重大な合併症である。

移植後日和見ウイルス感染症は、1) レシピエント(R)に潜伏感染していたウイルスの再活性化、2) 既感染ドナー(D)から移植臓器を介したウイルスの持ち込みによる初感染や再感染が多い。特に小児の場合は、D+/R-の組み合わせが多いため、移植後日和見ウイルス感染症を起こすリスクが高い。

本研究では、小児腎移植患者の腎移植後日和見ウイルス感染症の実態を把握する目的で、自施設で腎移植を行った小児例を後方視的に検討した。

B . 研究方法

2010年1月から2013年12月までの期間中に自施設で腎移植を実施した56例を対象とした。

56例のうち42例は生体腎移植、14例は献腎移植で、腎移植時の平均年齢は12.9±4.3歳であった。症例の原因疾患は、先天性腎尿路奇形が48.2%と最多で、次いで巣状分節性糸球体硬化症が16.1%であった。また、7例はABO血液型不適合腎移植、3例は生体肝移植後の生体腎移植(肝腎複合移植)であった。

基本的な免疫抑制プロトコールは、シクロスポリン(CYA)またはタクロリムス(FK)+ミコフェノール酸モフェチル(MMF)+ステロイド+バシリキシマブの4剤併用療法で、術後4~6か月の時点におけるCYAとFKの目標トラフ濃度は、それぞれ100~120ng/ml、6~8ng/mlとした。なお、ABO血液型不適合腎移植では、術前3週前にリツキシマブを単回投与し、血液型抗体の除去を目的として血漿交換療法を術前に2~4回実施した。

(倫理的側面に対する配慮)

本研究は「ヘルシンキ宣言」および「疫学研究に関する倫理指針」に従って実施した。

C. 研究結果

1. レシピエントの術前抗体陽性率

水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)と麻疹ウイルスは術前の予防接種を必須としているが、それぞれの抗体陽性率は、90.7%と98.1%であった。

サイトメガロウイルス(CMV)と Epstein-Barr ウイルス(EBV)の抗体陽性率は、それぞれ 51.8%と 69.6%であった。

2. CMV と EBV の D+/R- の組み合わせ

ドナーの CMV と EBV の抗体陽性率は、それぞれ 76.1%と 95.1%であった。

そして、D+/R-の組み合わせの腎移植の割合は、CMV は 30.4%、EBV は 26.1%であった。

3. CMV モニタリングと治療

CMV 感染のモニタリングは CMV 抗原血症法を用い、術後 2 週目より定期的に週 1 回測定した。また発熱を認めた際にも適宜測定して CMV 感染をモニタリングした。

D+/R-のハイリスクの場合は、CMV 抗原血症法が陽性となった時点でガンシクロビル(GCV)の preemptive 治療を開始すると同時に CYA/FK と MMF の減量を行った。D+/R+ や D-/R+ の場合には、まずは CYA/FK と MMF の減量を行い、減量でも制御できない場合には GCV の治療を行った。

以上の CMV モニタリングと preemptive 治療の結果、1 例で CMV 感染症(発熱と肝機能異常)が発症した。

4. EBV モニタリングと治療

EBV 感染のモニタリングは末梢血の EBVDNA の real-time PCR 法を用い、術後 1 か月目より定期的に月 1 回測定した。また発熱を認めた際にも適宜測定して EBV 感染をモニタリングした。そして基準値以上となった場合には、CYA/FK と MMF の減量を行った。

以上の EBV モニタリングと免疫抑制薬減量の結果、post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD)を発症した症例はなかった。

5. ポリオーマウイルス BK(BKV)モニタリングと BKV 腎症

BKV 感染のモニタリングは、尿沈渣で封入体細胞の出現や尿細胞診でデコイ細胞が同定された場合に血漿の BKV-PCR 法を実施した。そして BKV 血症が確認された場合には移植腎生検を行い、SV40 large T 抗原免疫組織染色を含む病理組織診断を行った。その結果、2 例で BKV 腎症を認めた。これら 2 例に対する治療として、FK から CYA への変更、CYA と MMF の減量、そして定期的な免疫グロブリン投与を行った。

6. その他の日和見ウイルス感染症の発症

術前の VZV 抗体陽性にもかかわらず腎移植後に水痘罹患した症例が 2 例、単純ヘルペスウイルス(HSV)1 型に罹患した症例が 2 例、そしてアデノウイルス(ADV)による出血性膀胱炎に罹患した症例が 1 例みられた。

D. 考察

小児腎移植患者の腎移植後日和見ウイルス感染症の実態を把握する目的で、2010 年 1 月から 2013 年 12 月までの期間中に自施設で腎移植を実施した 56 例を後方視的に検討した。その結果、CMV 感染症 1 例、BKV 腎症 2 例、水痘 2 例、HSV1 型 2 例、そして ADV による出血性膀胱炎 1 例と、約 14%の小児腎移植患者において腎移植後日和見感染症が発症した。

今回の検討では、CMV 感染症の発症は 1 例、そして EBV 関連 PTLD 発症例はなかったが、この理由の一つとして、今までの経験・知見を基にした CMV、EBV モニタリングの進歩と preemptive な GCV 投与や CYA/FK と MMF の減量の成果ではないかと思われる。しかしながら、免疫抑制薬減量に伴う拒絶反応発症の懸念がある。また、CMV 感染制御に数ヶ月を要した症例も少なからず存在し、これら症例では GCV の静注投与のために長期入院を与儀なくされた。これら症例では、長期間の GCV 投与に伴う GCV 耐性 CMV の出現も危惧される。また EBV の場合には、ウイルス量のモニタリングのみでは限界があることが知られており、また有効な抗ウイルス薬がないことも問題である。

今回の検討で特に問題となったのはBKV腎症であった。BKVの感染経路は不明であるが、幼少期に初感染し、一過性の上気道炎様症状とウイルス血症を呈した後、尿路系上皮細胞(尿管移行上皮, 尿細管上皮細胞)やリンパ球に潜伏感染する。成人のBKV抗体陽性率は、50~90%とされている。腎移植の場合、下部尿路に潜伏感染している成人ドナー由来のBKVが局所で再活性化し、BKV尿症→BKV血症→BKV腎症というステップでBKV腎症が発症する。当施設では、尿沈渣での封入体細胞の出現や尿細胞診でデコイ細胞が同定された場合に血漿のBKV-PCR法を実施し、そしてBKV血症が確認された場合には移植腎生検を行い、SV40 large T抗原免疫組織染色を含む病理組織診断を行うなど注意深いBKV感染モニタリングを実施している。それにも関わらず、2例でBKV腎症を合併した。BKV腎症の予後は明らかに不良であり、約50%の症例が5年以内に移植腎を喪失すると報告されている。これら2例に対する治療として、FKからCYAへの変更、CYAとMMFの減量、そして定期的な免疫グロブリン投与を行ったが、その有効性は明らかではなかった。国際的にも、BKV腎症に対する有効な治療法が開発されていないのが現状である。

最後に、CMVとEBVに関して、D+/R-の組み合わせの腎移植の割合は、CMVは30.4%、EBVは26.1%であった。BKVも含め各種ウイルスのD+/R-の組み合わせは年少児ほど多くなる。このように、小児腎移植患は移植後日和見ウイルス感染症を起こすリスクが高いため、移植後日和見ウイルス感染症に対する効果的なモニタリング方法の確立とウイルス特異的T細胞療法などの新たな治療法の開発・臨床応用が必要である。

E. 結論

小児腎移植患者の腎移植後日和見ウイルス感染症は、患者の生命予後のみならず移植腎機能予後を左右する重大な合併症であり、効果的なモニタリング方法の確立とウイルス特異

的T細胞療法などの新たな治療法の開発・臨床応用が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. **Hattori M**, Uemura O, Hataya H, Ito S, Ohta T, Fujinaga S, Gotoh Y, Kise T, Hisano M, Matsunaga A, Ito N, Akizawa T. Efficacy and safety of darbepoetin alfa for anemia in children with chronic kidney disease: a multicenter prospective study in Japan. *Clinical and Experimental Nephrology*. [Epub ahead of print] 2013.
2. Hamatani R, Otsu M, Chikamoto H, Akioka Y, **Hattori M**. Plasma homocysteine and folate levels and dietary folate intake in adolescents and young adults who underwent kidney transplantation during childhood. *Clinical and Experimental Nephrology*. [Epub ahead of print] 2013.
3. Fujii H, Chikamoto H, Akioka Y, **Hattori M**. Final adult height in kidney recipients who underwent highly successful transplantation as children: a single-center experience. *Clinical and Experimental Nephrology*. [Epub ahead of print] 2013.
4. Isojima T, Harita Y, Furuyama M, Sugawara N, Ishizuka K, Horita S, Kajiho Y, Miura K, Igarashi T, **Hattori M**, Kitanaka S. LMX1B mutation with residual transcriptional activity as a cause of isolated glomerulopathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 29: 81-8, 2013.
5. **Hattori M**, Matsunaga A, Akioka Y, Fujinaga S, Nagai T, Uemura O,

- Nakakura H, Ashida A, Kamei K, Ito S, Yamada T, Goto Y, Ota T, Hisano M, Komatsu Y, Itami N. Darbepoetin alfa for the treatment of anemia in children undergoing peritoneal dialysis: a multicenter prospective study in Japan. *Clinical and Experimental Nephrology* **17**: 582-8, 2013.
6. Miura K, Kurihara H, Horita S, Chikamoto H, **Hattori M**, Harita Y, Tsurumi H, Kajihō Y, Sawada Y, Sasaki S, Igarashi T, Kunishima S, Sekine T. Podocyte expression of nonmuscle myosin heavy chain-IIA decreases in idiopathic nephrotic syndrome, especially in focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology Dialysis Transplantation* **28**: 2993-3003, 2013.
7. Ishikura K, Uemura O, Ito S, Wada N, **Hattori M**, Ohashi Y, Hamasaki Y, Tanaka R, Nakanishi K, Kaneko T, Honda M. Pre-dialysis chronic kidney disease in children: results of a nationwide survey in Japan. *Nephrology Dialysis Transplantation* **28**: 2345-55, 2013.
8. Imamura H, Akioka Y, Asano T, Sugawara N, Ishizuka K, Chikamoto H, Taki M, Terasawa F, Okumura N, **Hattori M**. Successful living-related kidney transplantation on a boy with inherited dysfibrinogenemia. *Pediatric transplantation* **17**: E161-4, 2013.
9. Fukagawa M, Yokoyama K, Koiwa F, Taniguchi M, Shoji T, Kazama J, Komaba H, Ando R, Kakuta T, Fujii H, Nakayama M, Shibagaki Y, Fukumoto S, Fujii N, **Hattori M**, Ashida A, Iseki K, Shigematsu T, Tsukamoto Y, Tsubakihara Y, Tomo T, Hirakata H, Akizawa T. Clinical Practice Guideline for the Management of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*. **17**: 247-88, 2013.
10. Sugiyama H, Yokoyama H, Sato H, Saito Takao, Kohda Y, Nishi S, Tsuruya K, Kiyomoto H, Iida H, Sasaki T, Higuchi M, **Hattori M**, Oka K, Kagami S, Kawamura T, Takeda T, Hataya H, Fukasawa Y, Fukatsu A, Morozumi K, Yoshikawa N, Shimizu A, Kitamura H, Yuzawa Y, Matsuo S, Kiyohara Y, Joh K, Nagata M, Taguchi T, Makino H. Japan Renal Biopsy Registry and Japan Kidney Disease Registry: Committee Report for 2009 and 2010. *Clinical and Experimental Nephrology*. **17**: 155-73, 2013.
11. Yoshida Y, Honda S, Matsumoto M, Sawada Y, **Hattori M**, Hisanaga S, Hiwa R, Nakamura F, Tomomori M, Miyagawa S, Fujimaru R, Yamada H, Sawai T, Ikeda Y, Iwata N, Uemura O, Matsukuma E, Aizawa Y, Harada H, Wada H, Ishikawa E, ASHIDA A, Nangaku M, Miyata T, Fujimura Y. Analysis of genetic and predisposing factors in Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Molecular Immunology*. **54**: 238-46, 2013.
12. 大津美紀、濱谷亮子、**服部元史**：小児及び思春期・若年成人腎移植レシピエントの栄養摂取状況と食習慣の特徴に関する検討 *日本腎臓学会誌* **55**: 1320-6, 2013.
13. 西山慶、浅野達雄、菅原典子、石塚喜世伸、近本裕子、秋岡祐子、本田一穂、**服部元史**：幼児期に腎移植を行い思春期の成長スパートとともに蛋白尿の出現・増悪を認めた2例 *日本臨床腎移植学会雑誌* **1**: 97-100, 2013.
14. 秋岡祐子、浅野達雄、菅原典子、石塚喜世伸、久野正貴、近本裕子、藍原康雄、世川修、舟塚真、大澤眞木子、**服部**

- 元史**: 6年間の在宅腹膜透析治療を継続している超重症心身障害児の一例. **東京女子医科大学雑誌** 83(臨時): E670-4, 2013.
15. **Hattori M**: Apheresis in Children. *The Concise Manual of Apheresis Therapy* (Noiri E, Hanafusa N Ed.). p403-11, Springer 2013.
 16. Fujieda M, **Hattori M**: Cancer-infection interface in children after transplantation: posttransplant lymphoproliferative disorder and Epstein-Barr virus infection. *Current Opinion in Organ Transplantation* 18:549-54, 2013.
 17. **服部元史**, 佐古まゆみ, 金子徹治, 松永明, 芦田明, 五十嵐徹, 伊丹儀友, 上田善彦, 大田敏之, 後藤芳充, 里村憲一, 平松美佐子, 伊藤秀一, 上村治, 佐々木聡, 波多江健, 幡谷浩史, 藤枝幹也, 吉村仁志, 秋岡祐子, 石倉健司, 濱崎祐子, 大橋靖雄, 本田雅敬: 2006年~2011年までの期間中に新規発生した20歳未満の小児期末期腎不全患者の実態調査報告. **日本小児腎臓病学会雑誌** 26:154-64, 2013.
 18. **服部元史**, 佐古まゆみ, 金子徹治, 松永明, 芦田明, 五十嵐徹, 伊丹儀友, 上田善彦, 大田敏之, 後藤芳充, 里村憲一, 平松美佐子, 伊藤秀一, 上村治, 佐々木聡, 波多江健, 幡谷浩史, 藤枝幹也, 吉村仁志, 秋岡祐子, 石倉健司, 濱崎祐子, 大橋靖雄, 本田雅敬: 本邦小児末期腎不全患者の疫学調査報告: とくに腎移植に関して. **日本臨床腎移植学会雑誌** 1:273-81, 2013.
 19. 香美祥二, 岡田浩一, 要伸也, 佐藤和一, 南学正臣, 安田隆, **服部元史**, 芦田明, 幡谷浩史, 日高義彦, 澤井俊宏, 藤丸李可, 藤村吉博, 吉田瑤子: 非典型型溶血性尿毒症症候群診断基準. **日本腎臓学会誌** 55:91-3, 2013.
 20. 松尾清一, 川村哲也, 鈴木祐介, 城謙輔, 富野康日己, 堀越哲, 西野友哉, 吉川徳茂, **服部元史**, 木村健二郎, 安田隆, 白井小百合, 柴田孝則, 吉村光弘, 宇都宮保典, 遠藤正之, 坂本なほ子, 松島雅人, 宮崎陽一, 安田宣成, 横尾隆, 香美祥二, 幡谷浩史, 鈴木仁, 松崎慶一, 内田俊也, 伊藤孝史, 清水章, 片淵律子, 久野敏, 橋口明典: IgA腎症の寛解基準の提唱. **日本腎臓学会誌** 55:1249-54, 2013.
 21. 水口潤, 友雅司, 政金生人, 渡邊有三, 川西秀樹, 秋葉隆, 伊丹儀友, 小松康宏, 鈴木一之, 武本佳昭, 田部井薫, 土田健司, 中井滋, **服部元史**, 峰島三千男, 山本泰明, 斉藤明, 内藤秀宗, 平方秀樹: 維持血液透析ガイドライン: 血液透析処方. **日本透析医学会雑誌** 46:587-632, 2013.
 22. **服部元史**: 小児の成長障害にどう対処するか? CKD-MBDハンドブック(深川雅史編著). 日本メディカルセンター p188-90, 2013.
 23. **服部元史**: 小児に対する急性血液浄化法. 日本急性血液浄化学会標準マニュアル(日本急性血液浄化学会編). 医学図書出版 p230-7, 2013.
 24. **服部元史**, 芦田明: 小児におけるCKD-MBD. ガイドラインサポートハンドブック慢性腎臓病に伴う骨・ミネラル代謝異常(CKD-MBD)改訂版(深川雅史監修, 横山啓太郎編). 医薬ジャーナル社 p179-87, 2013.
 25. **服部元史**: Fabry病. 臨床腎臓内科学(安田隆, 平和伸仁, 小山雄太編). 南江堂 p722-6, 2013.
 26. **服部元史**: 小児の慢性糸球体腎炎. 今日の治療と看護(永井良三, 大田健総編集). 南江堂 p1285-6, 2013.
 27. **服部元史**: 特発性ネフローゼ症候群とIgA腎症. **診断と治療** 101:1839-43, 2013.
 28. **服部元史**: 小児腎性貧血に対するESA治療. **腎と透析** 75:391-5, 2013.

29. **服部元史**: 浮腫性疾患に対するループ利尿薬 - 基本的な考え方と使い方 - . **小児科** 54:1409-15, 2013.
 30. **服部元史**: 小児腎移植の現況. **臨床透析** 29:77-83, 2013.
 31. **服部元史**: 非典型 HUS と腎移植. **腎と透析** 74:1146-9, 2013.
 32. **服部元史**: 成長障害. **腎と透析** 74(増刊):424-30, 2013.
 33. **服部元史**: 慢性腎炎症候群. **小児科** 154(臨時増刊):627-32, 2013.
 34. **服部元史**: 学校検尿システムの概要. **小児科臨床** 66:567-73, 2013.
 35. **服部元史**, 芦田明: 小児 CKD 患者における CKD-MBD. **臨床透析** 29:83-8, 2013.
2. 学会発表
1. **Hattori M**, Uemura O, Hataya H, Ito S, Hisano M, Ohta T, Fujinaga S, Kise T, Goto Y, Matsunaga A, Hashimoto T, Tsutsumi Y, Ito N, Akizawa T: Efficacy And Safety Of Darbepoetin Alfa (DA) For Anemia In Children With CKD: A Multicenter Prospective Study In Japan. **50th ERA-EDTA Congress. Turkey, Istanbul.** May 2013.
 2. **服部元史**: 小児腎疾患のキャリアオーバー. **第 16 回福島腎フォーラム**, 特別講演、郡山市、2013 年 12 月
 3. **服部元史**: 小児腎疾患 ~ 検尿から腎移植まで ~ **一般検査セミナー2013EIKEN** 特別講演、千代田区、2013 年 11 月
 4. **服部元史**: 小児腎泌尿器疾患: 日常診療に直結した最近のトピックス. **第 106 回富山県小児科医会学術講演会**, 特別講演、富山市、2013 年 11 月
 5. **服部元史**: 小児腎疾患におけるアフェレシス. **第 34 回日本アフェレシス学会学術大会ワークショップ腎臓病におけるアフェレシスの新たな挑戦**, 軽井沢、2013 年 11 月
 6. **服部元史**: 小児腎移植の歩みと現況、そしてこれから. **第 4 回福岡県透析医学会学術集会**, 特別講演、福岡市、2013 年 10 月
 7. **服部元史**: 小児腎移植の歩みと現況. **第 12 回鹿児島小児腎疾患研究会** 特別講演、鹿児島市、2013 年 10 月
 8. **服部元史**: 小児末期腎不全の全国疫学調査. **第 58 回日本透析医学会学術集会・総会 学会委員会企画 8**, 福岡市、2013 年 6 月
 9. **服部元史**: 小児患者の腎性貧血治療ガイドラインの改訂に向けて. **第 58 回日本透析医学会学術集会・総会 学会委員会企画 1**, 福岡市、2013 年 6 月
 10. **服部元史**: 小児腎移植の現況と課題. **第 179 回宮崎県泌尿器科医会**, 特別講演、宮崎、2013 年 6 月
 11. **服部元史**: TTP/HUS. **第 56 回日本腎臓学会学術総会 特別企画 2**, 東京、2013 年 5 月
 12. **服部元史**: FSGS の病態と治療に関する最新の知見. **第 20 回小児腎疾患カンファレンス** 特別講演、大阪、2013 年 3 月
 13. **服部元史**: 小児腎移植の歩みと現況. **第 14 回四国小児腎疾患研究会** 特別講演、2013 年 10 月
 14. **服部元史**: 腎移植後 FSGS 再発: 臨床病理像・病態と治療. **第 46 回日本臨床腎移植学会シンポジウム 4**, 千葉、2013 年 1 月
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

**厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)
分担研究報告書**

小児肝移植患者の移植後日和見感染症の実態に関する検討

研究分担者 水田耕一 (自治医科大学 移植外科 准教授)

研究要旨：

小児肝移植患者におけるサイトメガロウイルス(CMV)やEBウイルス(EBV)などの日和見感染症は依然として頻度は高くその対応は重要である。小児肝移植後日和見感染症の現状を把握する目的で、2001年5月から2013年12月までに当施設で生体肝移植を施行した238例におけるCMV、EBV感染症の発症状況を後方視的に検討した。その結果、CMV感染33%、CMV感染症6%、EBV感染48%、EBV感染症(PTLD)1.3%の日和見感染症が発症した。CMV感染の危険因子は、原疾患がOTC欠損症、ドナーCMV抗体陽性、ステロイドパルス治療後であった。PTLDを発症した3例は、いずれも術前のEBV抗体はdonor+/recipient-で、タクロリムス、メチルプレドニゾロン、ミコフェノレートモフェチルの3剤で免疫抑制を行っていた。治療は、rituximab単剤療法、及び、rituximab併用のB-ALL型治療で寛解した。これら日和見感染症が原因のグラフト喪失や患者死亡は認めなかった。小児肝移植後の日和見感染症は、重症例では致死性であるため、治療困難例におけるウイルス特異的T細胞療法などの新たな治療法の開発が必要である。
キーワード:小児/生体肝移植/移植後日和見感染症

A. 研究目的

臓器移植後のサイトメガロウイルス(CMV)やEBウイルス(EBV)感染症は、致死的な合併症へと進展する重篤な感染症であり、特に小児例においてはその対策は重要である。

本研究では、小児肝移植後日和見感染症の現状を把握する目的で、当施設で肝移植を施行した小児肝移植患者における感染症の発症状況を後方視的に検討した。

B. 研究方法

2001年5月から2013年12月までの期間中に自施設で生体肝移植を施行した238例を対象とした。肝移植時の平均年齢は 3.3 ± 4.7 歳であった。疾患は胆道閉鎖症で175例と最多で全体の75%を占めた。次いでOTC欠損症17例(7%)、Alagille症候群10例(4%)などであった。移植後の免疫抑制薬は、タクロリムス(FK)+メチルプレドニゾロン(MP)の2剤を基本とした。FKの目標トラフ濃度は、術後2週間は15

~20ng/ml、術後1か月時は10ng/ml、術後6か月時は6ng/ml、術後1年時は3~5ng/mlとした。

(倫理的側面に対する配慮)

本研究は「ヘルシンキ宣言」および「疫学研究に関する倫理指針」に従って実施した。

C. 研究結果

1. CMV感染症

当施設における小児生体肝移植後CMV感染症の検討では、移植後CMV感染率(CMV抗原陽性率)は33%であり、感染症は6%であった。その危険因子は、原疾患がOTC欠損症、ドナーCMV抗体陽性、ステロイドパルス治療後であった。CMVが原因のグラフト喪失や患者死亡は認めなかった。

2. CMVモニタリングと治療

CMV感染症に対する治療戦略としては、移植後2週間目より3か月までは、1~2週間に1回、6か月までは2~4週に1回の頻度で、定期的に

アンチゲネミア法を測定し、陽性細胞が1個でも認められたらバルガンシクロビル(VGCV)の先制治療を行った。発熱、下血などCMV感染症と判断した場合は直ちにガンシクロビル(GCV)の点滴治療を行い、VGCVの先制治療後に有症状のCMV感染症が疑われた場合もGCVの点滴治療に切り替えた。また、GCV治療後は、VGCVによる維持療法を行い、アンチゲネミア法で2回続けて陰性になるのを確認して中止した。VGCVの予防投与は、遅発性CMV感染の出現と薬剤耐性獲得の問題から行っていない。また、CMV治療中の免疫抑制療法は、重篤なCMV感染症や難治性CMV感染を除き、積極的な減量は行わず、基本的には現状維持とした。

3. EBV感染症

対象において、EBV再活性化(EBV-DNA \geq 5000)は48%に認めた。また3例(1.3%)のEBV関連移植後リンパ増殖性疾患(PTLD)を経験した。症例1は10歳女児。polymorphic PTLD (Latency III、病期II)で免疫抑制剤の減量後も腫瘍が残存したがrituximab 8コースで寛解した。症例2は1歳11か月男児。monomorphic PTLD (Latency III、病期II)で免疫抑制剤減量に反応せず、rituximab 5コースでも部分寛解であったがR-CHOP療法4コースで寛解した。症例3は4歳女児。Burkitt型白血病(Latency I)でrituximab併用のB-ALL型治療で寛解した。PTLD診断後25~28か月の現在、全例が無病生存している。

4. EBVモニタリングと治療

EBV感染のモニタリングは末梢血によるEBVDNAのreal-time PCR法を用い、術後2か月目より定期的に月1回測定した。また、発熱、下痢などの有症状時も適宜、追加で測定し、EBV感染をモニタリングした。EBV-DNA 5000コピー以上を異常値とし、5000コピー以上の場合は、以下の表のように25-50%免疫抑制剤を減量した。

測定日 (術後)	EBV-DNA <5,000	EBV-DNA \geq 5,000	EBV-DNA \geq 10,000
2ヶ月	通常量	50%減量	
5ヶ月	通常量	25%減量	50%減量
10ヶ月	通常量		25%減量

D. 考察

本研究では、小児肝移植後日和見感染症の現状を把握する目的で、当施設で肝移植を施行した小児肝移植患者における感染症の発症状況を後方視的に検討した。

その結果、CMV感染33%、CMV感染症6%、EBV感染48%、EBV感染症(PTLD)1.3%の日和見感染症が発症した。

CMV感染症では、腸炎を3例に認めた。CMV腸炎は、腹痛、下痢、吐血などの症状が現れ、病変は、多発する打ち抜き様潰瘍が特徴的所見で、食道から直腸までの全消化管において粘膜下潰瘍を伴う出血や穿孔を来し得る。潰瘍病変では、CMVアンチゲネミア法の陽性細胞数と病勢が一致しない場合があるため、症状にてCMV腸炎が疑われた場合は、積極的な内視鏡検査が重要で、可能であれば生検を行い、免疫組織化学染色にて核内封入体細胞を確認する。

EBV感染症では、PTLDを3例に経験した。いずれも術前のEBV抗体はdonor+/recipient-で、FK+MP+ミコフェノレートモフェチル(MMF)の3剤で免疫抑制を行っていた。また、症例1と症例2の発症時EBV-DNAは170コピーと1800コピーで比較的低値だった。

治療は、EBV関連PTLDのほとんどはEBVの潜伏様式がlatency IIIであるため、EBVに対する細胞傷害性T細胞がその排除に有効と考えられ、まず、免疫抑制剤の減量が推奨されている。polymorphic PTLDではこれにより治癒すること

もあるが、monomorphic PTLDでは多剤併用化学療法を行っても寛解率は70%に達せず、移植臓器を喪失することもある。PTLD症例に対しては、rituximab単剤1週毎4回投与を行い、非寛解例にはG-CSF併用R-CHOPを3週毎4サイクル使用するrituximabの層別化治療が報告されている。症例1、2はこの方法に則りrituximab単剤への反応性で層別化した治療を行い、重大な有害事象なく寛解した。症例3のBurkitt型のPTLDは非常に稀である。ほとんどがEBV関連であるが、潜伏様式は他のEBV関連PTLDとは異なりlatency Iである細胞傷害性T細胞の作用は期待できない。他のmonomorphic PTLDよりも増殖速度が速く、免疫抑制剤の中止には反応しないが、高リスク悪性リンパ腫に対する化学療法の速やかな導入により予後改善が期待できる。症例3は白血病化しlatency Iであったため、rituximabを併用したB細胞型急性リンパ性白血病に準じた化学療法を選択し奏功したが、PTLDの場合、Burkitt型であっても、R-CHOPで治療可能かもしれない。PTLDは致死率の高い病態だが、組織型や病期、EBVのlatency、治療反応性により層別化した治療を行うことで治療成績を改善できる可能性がある。

E . 結論

小児肝移植患者のCMV、EBVなどの日和見感染症は依然として頻度は高く、その対応は重要である。重症例においては、患者の生命予後に直結する合併症であるため、治療困難例におけるウイルス特異的T細胞療法などの新たな治療法の開発が必要である。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

1 . 論文発表

1. Wakiya T, Sanada Y, **Mizuta K**, Urahashi T, Ihara Y, Yamada N, Okada N, Egami S, Nakata M, Hakamada K, Yasuda Y. A comparison of open surgery and endovascular intervention for hepatic artery complications after pediatric liver transplantation. *Transplant Proc.* **45**: 323-329, 2013.
2. Urahashi T, Ihara Y, Sanada Y, Wakiya T, Yamada N, Okada N, **Mizuta K**. Effect of repeat kasai hepatic portoenterostomy on pediatric live-donor liver graft for biliary atresia. *Exp Clin Transplant.* **11**:259-263, 2013.
3. Wakiya T, Urahashi T, Ihara Y, Sanada Y, Yamada N, Okada N, Hakamada K, **Mizuta K**. Decreased portal vein flow during Kawasaki disease in a liver transplant patient. *Pediatr Int.* **55**: e119-122, 2013.
4. Sanada Y, **Mizuta K**, Urahashi T, Ihara Y, Wakiya T, Okada N, Yamada N, Ushijima K, Otomo S, Sakamoto K, Yasuda Y, Kawarasaki H. Impact of endotoxin measured by an endotoxin activity assay during liver transplantation. *J Surg Res.* **180**:349-355, 2013.
5. Sanada Y, Wakiya T, Hishikawa S, Hirata Y, Yamada N, Okada N, Ihara Y, Urahashi T, **Mizuta K**, Kobayashi E. Risk factors and treatments for hepatic arterial complications in pediatric living donor liver transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* [Epub ahead of print] 2013.
6. Urahashi T, **Mizuta K**, Ihara Y, Sanada Y, Wakiya T, Yamada N, Okada N: Impact of Post-transplant Flow Cytometric Panel Reactive Antibodies on Late Onset Hepatic Venous Outflow Obstruction following Pediatric Living Donor Liver Transplantation. *Transpl Int.* [Epub ahead of print] 2013.
7. Sanada Y, Kawano Y, Miki A, Aida J, Nakamura KI, Shimomura N, Ishikawa N, Arai T, Hirata Y, Yamada N, Okada N, Wakiya T, Ihara Y, Urahashi T, Yasuda Y, Takubo K, **Mizuta K**. Maternal grafts

protect daughter recipients from acute cellular rejection after pediatric living donor liver transplantation for biliary atresia. *Transpl Int*. [Epub ahead of print] 2013.

なし

3. その他

なし

2. 学会発表

1. **水田耕一**、他:初回肝移植後長期に再移植となった2例. **第12回肝移植医療フォーラム** 東京 2013年2月
2. **水田耕一**、浦橋泰然、井原欣幸、眞田幸弘、岡田憲樹、山田直也、江上聡、菱川修司、佐久間康成、清水敦、笹沼英紀、兼田 裕司、藤原岳人、俵藤正信、安田 是和:
肝移植手術における技術的困難例に対する戦略 新生児劇症肝不全に対するS2単区域グラフトを用いた生体肝移植. **第113回日本外科学会定期学術集会**、福岡、2013年4月
3. **水田耕一**、他:シンポジウム5「肝移植後のよりよい長期生着への取り組み」 小児肝移植患者における長期管理の課題と工夫. **第31回日本肝移植研究会**、熊本、2013年7月
4. **水田耕一**、浦橋泰然、井原欣幸、眞田幸弘、岡田憲樹、山田直也、平田雄大、佐久間康成、笹沼英紀、安田是和:新生児期発症先天代謝異常症と新生児劇症肝不全に対する肝移植治療. **第49回日本移植学会総会**、大阪、2013年9月
5. Yamada N, Wakiya T, Urahashi T, Ihara Y, Sanada Y, Okada N, **Mizuta K**.
Disseminated varicella-zoster infection after pediatric living donor liver transplantation (LDLT); a case report.
13th Congress of the Asian Society of Transplantation. Kyoto, Japan. Sep 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Nagasawa M, Ohkawa T, Endo A, Mitsuiki N, Ono T, Aoki Y, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Kajiwaru M, Morio T , Mizutani S.	Early coagulation disorder after allogeneic stem cell transplantation is a strong prognostic factor for transplantation-related mortality, and intervention with recombinant human thrombomodulin improves the outcome: a single-center experience.	Int J Hematol.	98	533-42	2013
Kumaki S, Sasahara Y, Kamachi Y, Muramatsu H, Morio T , Goi K, Sugita K, Urabe T, Takada H, Kojima S, Tsuchiya S, Hara T.	B-cell function after unrelated umbilical cord blood transplantation using a minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID.	Int J Hematol.	98	355-60	2013
渡辺恵理、阿部素子、工藤寿子、浜田聡、糸洲倫江、中内啓光、 森尾友宏 、渡辺信和	重症複合免疫不全症に対する臍帯血ミニ移植後の混合キメラズの遷延	CYTOMETRY RESEARCH	23	41-9	2013
森尾友宏	インフルエンザに対する自然及び獲得免疫応答	小児内科	45	1947-51	2013
森尾友宏 、宮坂あかね、小野敏明、落合央、藤田由利子、高橋聡	移植後ウイルス感染に対する多ウイルス特異的 CTL 療法	日本小児血液がん学会雑誌	50	335-40	2013
森尾友宏	間葉系幹細胞による移植片対宿主病の治療	臨床免疫・アレルギー科	60	210-7	2013

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaru K, Tojo A, <u>Takahashi S.</u>	Effect of ABO Blood Group Incompatibility on the Outcome of Single-Unit Cord Blood Transplantation after Myeloablative Conditioning.	Biol Blood Marrow Transplant.		[Epub ahead of print]	2013
Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaru K, Asano S, Tojo A, <u>Takahashi S.</u>	Single-Unit Cord Blood Transplantation after Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Combined Myeloablative Conditioning for Myeloid Malignancies Not in Remission.	Biol Blood Marrow Transplant.		[Epub ahead of print]	2013
Doki N, Miyawaki S, Tanaka M, Kudo D, Wake A, Oshima K, Fujita H, Uehara T, Hyo R, Mori T, <u>Takahashi S,</u> Okamoto S, Sakamaki H. Kanto Study Group for Cell Therapy	Visceral varicella zoster virus infection after allogeneic stem cell transplantation. Kanto Study Group for Cell Therapy.	Transpl Infect Dis.	15	314-8	2013
Kato K, Otake H, Tagaya M, <u>Takahashi Y,</u> Ito Y, Hama A, Muramatsu H, Kojima S, Naganawa S, Nakashima T.	Progressive hearing loss following acquired cytomegalovirus infection in an immunocompromised child.	Am J Otolaryngol.	34	89-92	2013

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Takahashi Y , Muramatsu H, Sakata N, Hyakuna N, Hamamoto K, Kobayashi R, Ito E, Yagasaki H, Ohara A, Kikuchi A, Morimoto A, Yabe H, Kudo K, Watanabe K, Ohga S, Kojima S and Japan Childhood Aplastic Anemia Study G.	Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic anemia.	Blood.	121	862-4	2014
Teeranaipong P, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Koibuchi T, Nakamura H, Koga M, Kondo N, Gao GF, Hoshino H, Matsuda Z, Iwamoto A.	Development of a rapid cell-fusion-based phenotypic HIV-1 tropism assay.	J Int AIDS Soc	16	18723	2013
Shimizu A, Kawana-Tachikawa A, Yamagata A, Han C, Zhu D, Sato Y, Nakamura H, Koibuchi T, Carlson J, Martin E, Brumme CJ, Shi Y, Gao GF, Brumme ZL, Fukai S, Iwamoto A.	Structure of TCR and antigen complexes at an immunodominant CTL epitope in HIV-1 infection.	Sci Rep	3	3097	2013
Fujieda M, Hattori M.	Cancer-infection interface in children after transplantation: posttransplant lymphoproliferative disorder and Epstein-Barr virus infection.	Current Opinion in Organ Transplantation	18	549-54	2013
服部元史	小児腎移植の現況	臨牀透析	29	77-83	2013

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Sanada Y, Mizuta K , Urahashi T, Ihara Y, Wakiya T, Okada N, Yamada N, Ushijima K, Otomo S, Sakamoto K, Yasuda Y, Kawarasaki H.	Impact of endotoxin measured by an endotoxin activity assay during liver transplantation.	J Surg Res.	180	349-55	2013
Sanada Y, Wakiya T, Hishikawa S, Hirata Y, Yamada N, Okada N, Ihara Y, Urahashi T, Mizuta K , Kobayashi E.	Risk factors and treatments for hepatic arterial complications in pediatric living donor liver transplantation.	J Hepatobiliary Pancreat Sci.		In press	2013