

の柔道およびレスリング選手に本菌感染の集団発生が報告されるようになった。

【目的】 白癬菌の菌種同定は、培養によるものであったが、近年分子生物学的手法の進歩により様々な菌種の迅速同定、診断が可能となった。今回、*T. tonsurans* 感染症の患者から分離培養したコロニーからPCR法による迅速同定を試みた。

【対象】 *T. tonsurans* 分離株6株、およびその他主要な皮膚糸状菌18菌種、93株である。また、本法を利用し、某大学柔道部員約74名の検診を行い、起因菌の同定を行った。

【方法】 18SリボゾームRNA遺伝子(rDNA)と5.8S-rDNAに挟まれたスペイサー領域であるinternal transcribed spacer 1 (ITS1)の塩基配列から、本菌特異的プライマーを設計した。この領域は皮膚糸状菌に関して、種間の保存性が高く、菌種ごとの配列情報が豊富であるため利用した。プライマー対はTons-forwardとTons-reverseを作製し、内側にnested PCRを施行した。

【結果】 Nested PCRの結果 *T. tonsurans* に特異的な約200bpのsingle bandを認め、全塩基配列が同一であることを同定した。検診の結果10名の患者から本菌に一致するコロニーが分離され、本プライマーを用いたPCR法にて全て、*T. tonsurans* と同定できた。

【結論】 今回デザインしたプライマー対を用いてPCRによる迅速同定が可能となり、*T. tonsurans* 感染症の早期診断に役立つと思われる。

## 6. RNA interference を用いた癌の遺伝子治療法の開発

(病理学第一)

○黒田 雅彦、及川 恒輔、泉 美貴  
岩屋 啓一、向井 清

RNA干渉法(RNA interference、RNAi)は、遺伝子の情報に基づくタンパク質生合成の中間生成物であるRNAを分解させることによって遺伝子機能を抑える新技術である。従来の代表的な遺伝子抑制技術であるアンチセンス法に比べて抑制効率も高く、また1/100程度の量で効果を発揮するともいわれ、PCR法以来の革命的な技術と考えられる。1998年に線虫の

実験で見つかったのに続き、2001年にドイツのグループがヒト細胞での実験に成功し医療応用の可能性も開け研究が活発になっている。特に、AIDSやウイルス肝炎などの重篤なウイルス性疾患の治療にRNAiを用いる臨床研究が実用化段階にはいつている。

このような背景から、我々は癌の分子標的治療にRNAiの技術を応用することを検討した。具体的には、我々は最近、新規癌遺伝子*T1-15*を単離し、本遺伝子が癌組織に高発現していることを明らかにしたことから、*T1-15*を標的としたsmall interference RNA (siRNA)を設計した。*T1-15*が高発現しているヒト癌由来培養細胞株にそのsiRNAを導入した結果、RNAiの効果により*T1-15*の発現が抑制され、細胞死が誘導された。そこで、さらに*in vivo*での効果を確認するために、*T1-15*が高発現しているヒト由来培養細胞株をヌードマウスに移植して腫瘍を形成させ、その腫瘍に*T1-15* siRNAを局注して検討を行なった結果、siRNAを導入した腫瘍において、著しい増殖阻害が観察された。以上の結果から、*T1-15* siRNAが腫瘍増殖抑制作用を有することが明らかになった。さらに、臨床応用も視野に入れ、*T1-15*を標的分子としたsiRNA発現レトロウイルスベクターを作成した。現在、本ベクターを用いた検討を行っているところであるが、siRNAを直接導入した際と同様の結果を得ている。本システムが今後siRNAを用いた癌治療に応用できることが期待される。

## 7. 癌抗原ペプチドを用いた免疫細胞治療

(泌尿器科学)

○大野 芳正、吉岡 邦彦、秦野 直  
青柳貞一郎、並木 一典、古賀 祥嗣  
黄 英茂、松井 善一、坂本 昇  
松本 一宏、中神 義弘、橘 政昭

キーワード：泌尿器科癌、免疫療法、樹状細胞

【要旨】 泌尿器科進行癌、再発例14例に対して自己末梢血単核球由来樹状細胞を用いた免疫細胞治療を行った。内訳は腎癌8例、前立腺癌4例、尿路上皮癌2例である。樹状細胞は、末梢血単核球よりGM-CSFとIL-4にて2週間培養し誘導した。前立腺癌ではHLA-A24拘束性前立腺特異的膜抗原エプー

プ・ペプチドで、尿路上皮癌では HLA-A24 拘束性メラノーマ抗原 3 エピトープ・ペプチドで樹状細胞をパルスし 2 週間毎に皮下投与した。評価可能であった 9 例中、画像上 PR 1 例、腫瘍マーカー上 PR 1 例、画像上 MR 1 例が認められた。重篤な副作用は認められず、QOL を損なうことなく施行可能であった。

### はじめに

放射線療法、化学療法に対して抵抗性を示す進行癌に対する新たな治療法の確立は、泌尿器科医のみならず多くの臨床医にとって期待される場所である。現在強力な抗原提示能を有する樹状細胞を用いた免疫療法が様々な領域において試みられている。泌尿器科領域では、浸潤性膀胱癌でメラノーマ抗原 3 melanoma antigen-3 (MAGE-3)、ホルモン不応性前立腺癌で前立腺特異的膜抗原 prostate specific membrane antigen (PSMA) が高率に発現しており、これまでに HLA-A24 拘束性 MAGE-3<sup>1)</sup> および PSMA エピトープ・ペプチド<sup>2)</sup> が同定され、これらのエピトープ・ペプチドで自己末梢血由来樹状細胞を負荷することにより特異的細胞傷害 T 細胞を誘導しうる事が明らかにされている。当教室では既存治療に抵抗性を示す進行癌患者を対象に、これらのペプチドを用いた樹状細胞免疫細胞治療を行っており、これまでの成績を報告するとともに現状での問題点、今後の展望について報告する。

### 対象と方法

対象症例は、病期Ⅳの進行癌症例および再発例であり、抗癌化学療法、放射線療法等の既存治療により改善が期待できない症例であり、患者または家族の同意

を written にて得た症例である。前立腺癌および尿路上皮癌症例では原則として HLA-A24 陽性患者とした。除外基準は、重大な全身性の感染症、血液凝固異常疾患、心臓疾患、呼吸器疾患を有するもの、ステロイド治療を施行中の患者、妊娠中の患者、アレルギー素因およびワクチンなどの生物学的製剤に対して過敏症を有する患者である。

樹状細胞は、自己末梢血 50 ml より Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Sweden) を使用し比重遠心法にて単核球を分離し、25 cm<sup>2</sup> フラスコにて 24 時間培養後付着細胞に対して GM-CSF 1,000 U/ml (PeploTech EC, UK)、IL-4 2,000 U/ml (PeploTech EC, UK) を添加し 2 週間培養し誘導した (図 1)。誘導された樹状細胞を尿路上皮癌患者においては HLA-A24 拘束性 MAGE-3 エピトープ・ペプチド (IMPKAGL-LI) で、前立腺癌患者においては HLA-A24 拘束性 PSMA エピトープ・ペプチド (LYSDPADYF) により投与前に 4 時間かけてパルスし、患者皮下に投与した。原則として樹状細胞投与と同時に 50 ml 採血し次回投与用の樹状細胞を誘導開始、投与は可能な限り 2 週間毎に反復させた。

治療効果判定は、血清腫瘍マーカーおよび画像診断にて行った。

### 結 果

2000 年 9 月から 2003 年 8 月までに 14 例の症例が登録された。年齢は 42~76 歳 (中央値: 63 歳)、男性 11 例、女性 3 例であった。原発腫瘍は、腎癌 8 例、前立腺癌 4 例、尿路上皮癌 2 例である。各症例の詳細については表 1 に示した。全例において重篤な副作用は認められなかった。現在までに治療効果が評価可能で

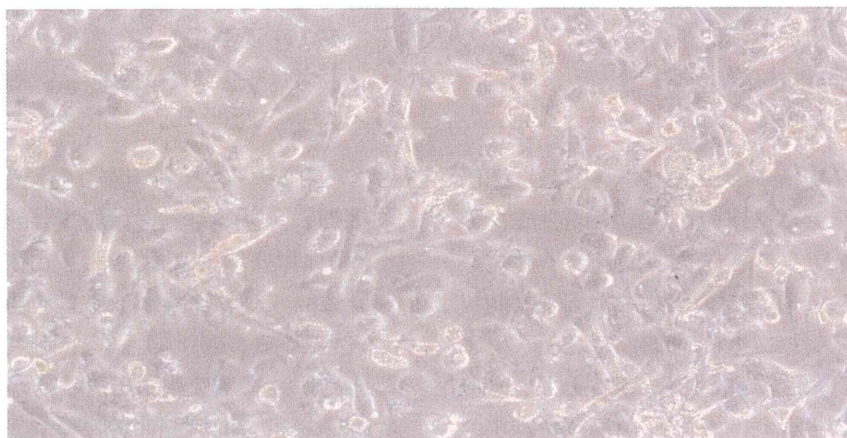


図 1. 誘導された樹状細胞

表1. 症 例

Case	Sex	Age	Primary	Histology	Prior therapy	Metastases	Recurrence	Peptide	response
1	M	42	Kidney	Clear cell ca.	IL2	PUL, LYM		none	PD
2	M	52	Kidney	Clear cell ca.	IFN, IL2	PUL		none	PD
3	M	56	Kidney	Clear cell ca.	IL2	PUL, Brain		none	PR
4	F	58	Kidney	Granular cell ca.	IL2	PUL, LYM		none	PD
5	M	58	Kidney	Clear cell ca.	IL2	PUL, OSS, Brain		none	
6	M	60	Kidney	Clear cell ca.	IFN, IL2	PUL		none	
7	F	66	Kidney	Clear cell ca.	IL2	PUL		none	
8	F	72	Kidney	Clear cell ca.	IFN, IL2	PUL		none	
9	M	56	Prostate	Adenocarcinoma	hormone	OSS		PSMA	PR
10	M	68	Prostate	Adenocarcinoma	hormone	LYM, Local		PSMA	
11	M	69	Prostate	Adenocarcinoma	hormone	OSS		PSMA	PD
12	M	73	Prostate	Adenocarcinoma	hormone	OSS		PSMA	PD
13	M	70	Urothelium	UC	Chemo, RT	Local		MAGE3	SD
14	M	76	Urothelium	UC	Chemo, RT	Local		MAGE3	PR

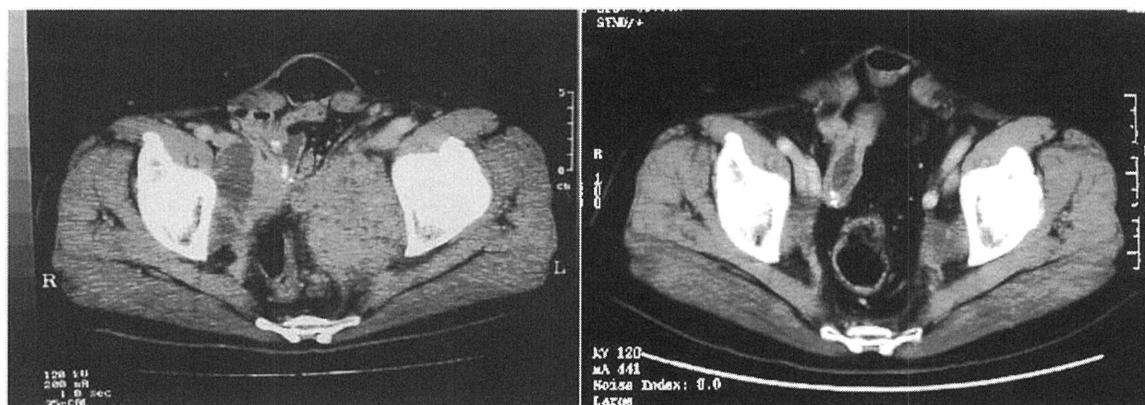


図2. 放射線療法施行後および樹状細胞44回投与後CT像

あったのは9例で、画像上 Partial response (PR) が1例、minor response (MR) が1例、血清学上 PR が1例、stable disease (SD) 1例、progressive disease (PD) 5例であった。効果のみられた3症例を提示する。

#### 症例1

70歳男性で膀胱癌術後骨盤内再発症例である。1998年浸潤性膀胱癌のため膀胱全摘除術・回腸導管造設術を受けた。2000年に骨盤内に再発し methotrexate, vinblastine, adriamycin, cisplatin による多剤併用化学療法、放射線療法が行われたがいずれも効果を認めなかった。このため樹状細胞による免疫細胞治療を開始した。樹状細胞10回投与後には再発腫瘍は、著明に縮小した。開始2年後の現在も残存腫瘍の増大傾向を認めていない(図2)。

#### 症例2

68歳男性、ホルモン不応性前立腺癌患者である。

1999年病期Ⅳ前立腺癌(骨転移)と診断され、ホルモン療法を受けていたが、2001年頃より血清前立腺特異抗原(PSA)値の上昇傾向が見られ始めた。2002年10月より明らかなPSA上昇を示したため ifosphamide, cisplatin による多剤併用化学療法を開始した。しかし、開始後も徐々にPSA値が上昇するため2003年2月より樹状細胞による免疫細胞治療を開始した。免疫療法開始前血清PSA値は42.6 ng/mlであったが、徐々に減少し17.2 ng/mlまで下降した(図3)。

#### 症例3

58歳男性。転移性腎癌患者である。2002年12月他院にて転移性脳腫瘍の診断にて手術を受け、腎癌脳転移と診断され当科に紹介された。右腎全摘除術後肺転移巣に対してインターロイキン2による免疫療法を行っていたが、徐々に肺転移巣は増大、また新たな脳転移巣が出現した。脳転移巣を摘出し樹状細胞による

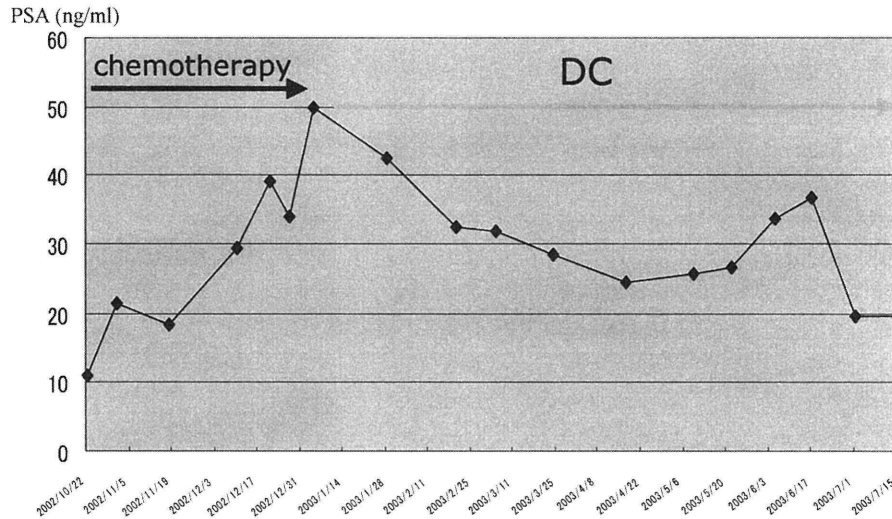


図3. 血清 PSA 値の推移

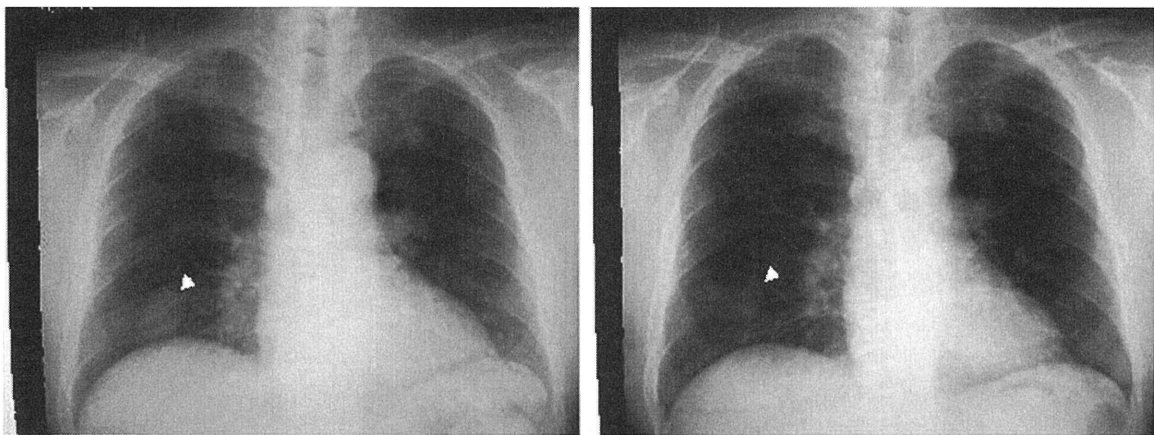


図4. 樹状細胞開始前および後の胸部 X 線写真

免疫細胞治療を開始した。開始後3ヶ月で肺転移巣の縮小が認められている (図4)。

### 考 察

進行癌患者に対する化学療法、放射線療法の効果は必ずしも満足のものではなく、新たな治療法の確立が望まれている。1991年 van-der-Bruggen ら<sup>3)</sup>はメラノーマにおいて細胞傷害性 T 細胞が認識するヒト癌抗原をコードする遺伝子 (メラノーマ抗原 1) を初めてクローニングした。その後現在までに様々な腫瘍において腫瘍 (癌) 抗原が同定されている。これとともに分子生物学的手法を用いた腫瘍免疫学の進歩は、強力な抗原提示細胞である樹状細胞と癌抗原を組み合わせた癌特異的免疫療法の可能性をもたらした。これまですでにメラノーマ<sup>4-6)</sup>、悪性リンパ腫<sup>7)</sup>、神経膠腫<sup>8)</sup>、前立腺癌<sup>9)</sup>、腎癌、膀胱癌<sup>1)</sup> などにおいて試みられている。重篤な副作用も少なく、完全緩解例、部分

緩解例も認められその有効性が期待されるが、全体としての治療成績は観察期間も十分でなく、今後のさらなる検討が必要と考えられる。樹状細胞を用いた癌特異的免疫療法における現状での問題点としては、治療法の標準化が挙げられる。これまでの報告では、樹状細胞のソース (末梢血単核球または CD34 陽性細胞)、成熟度 (未熟または成熟樹状細胞)、癌抗原の負荷 (エピトープ・ペプチド、腫瘍溶解産物、腫瘍タンパク、腫瘍抽出 RNA・DNA など)、投与方法 (静脈投与、皮下注射、リンパ節内投与など) が様々であり、最も有効な癌特異的 CTL 誘導法の確立が期待される場所である。また、従来の化学療法、放射線治療などにおける腫瘍縮小効果のみで免疫治療を評価することには限界があり、免疫学的モニタリング、非進行生存期間など新たな評価法についても検討が必要であると考えられる。

今回の研究では、14例中評価可能であった9例で、

PR が2例に、MR が1例に認められた。癌腫が複数にわたっており、個々の症例数も十分でないことより、現時点でその有効性について結論づけることはできない。しかし、重篤な副作用が認められず QOL を損なうことなく施行可能であることは、今後進行癌に対する新たな治療法の一つとなり得ると考えられた。また、症例1において2年間腫瘍の増大を認めず PR を維持していることは、非進行生存期間が本治療法の評価法として重要であることを示唆していると考えられた。

## 文 献

- 1) Nishiyama T, Tachibana M, Horiguchi Y, Nakamura K, Ikeda Y, Takesako K, Murai M: Immunotherapy of Bladder Cancer Using Autologous Dendritic Cells Pulsed with Human Lymphocyte Antigen-A24-specific MAGE-3 Peptide. *Clin Cancer Res* **7**: 23-31, 2001
- 2) Horiguchi Y, Nukaya I, Okazawa K, Kawashima I, Fikes J, Sette A, Tachibana M, Takesako K, Murai M: Screening of HLA-A24-restricted Epitope Peptides from Prostate-specific Membrane Antigen That Induce Specific Antitumor Cytotoxic T Lymphocytes. *Clin Cancer Res* **8**: 3885-3892, 2002
- 3) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**: 1643-1647, 1991
- 4) Panelli MC, Wunderlich J, Jeffries J, Wang E, Mixon A, Rosenberg SA, Marincola FM: Phase I study in patients with metastatic melanoma of immunization with dendritic cells presenting epitopes derived from the melanoma-associated antigens MART-1 and gp100. *J Immunother* **23**: 487-98, 2000
- 5) Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G: Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* **190**: 1669-78, 1999
- 6) Thomas R, Chambers M, Boytar R, Barker K, Cavanagh LL, MacFadyen S, Smithers M, Jenkins M, Andersen J: Immature human monocyte-derived dendritic cells migrate rapidly to draining lymph nodes after intradermal injection for melanoma immunotherapy. *Melanoma Res* **9**: 474-81, 1999
- 7) Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R: Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* **2**: 52-8, 1996
- 8) Kikuchi T, Akasaki Y, Irie M, Homma S, Abe T, Ohno T: Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells. *Cancer Immunol Immunother* **50**: 337-44, 2001
- 9) Murphy GP, Tjoa BA, Simmons SJ, Ragde H, Rogers M, Elgamal A, Kenny GM, Troychak MJ, Salgaller ML, Boynton AL: Phase II prostate cancer vaccine trial: report of a study involving 37 patients with disease recurrence following primary treatment. *Prostate* **39**: 54-9, 1999

## 8. CO<sub>2</sub>-MDCT (Multidetector-row CT) を用いた子宮内腔病変に対する仮想内視鏡の試み

(産科婦人科学)

○仲地 紀智、赤枝 朋嘉、井坂 恵一

【目的】近年、各領域での仮想内視鏡 (Virtual Endoscopy: VE) の試みが行われその有用性が報告されている。仮想内視鏡とは、体内の管腔構造を有する部位の二次元画像より computer graphics (CG) の技法を用いて内腔を立体表示し、あたかも内視鏡で観察しているかのような三次元画像を作成する手法である。婦人科領域においては、子宮が管腔構造を呈しているものの子宮内腔の三次元画像を作製することは不可能であった。そこで今回我々は粘膜下筋腫症例に対し子宮内腔を拡張させ CO<sub>2</sub>-MDCT (Multidetector-row CT) を撮影の後、得られた画像から VE を作製し、子宮内腔イメージングとの比較及び VE の有用性に関し検討したので報告する。

【方法】術前に CO<sub>2</sub>-MDCT を施行した粘膜下筋腫を対象とした。撮影の際、造影剤注入時に子宮内腔に挿入されたバルーン付きカテーテルより用手的に CO<sub>2</sub> ガスを注入し、子宮内腔を拡張させ撮像を行った。その得られたスライス画像から Advantage Workstation Ver. 4 により VE を作製し、実際の子宮内腔イメージングとの比較を行った。

【結果】いずれの症例も子宮内腔の拡張性は良好で、明瞭な VE 画像を得ることができた。腫瘍表面の質感を描出するまではいかないものの、粘膜下筋腫の