

(6-6) 成熟樹状細胞の誘導と抗原ペプチド添加 (第6回目)

[目的]

(5) で作製した未熟樹状細胞を成熟樹状細胞に誘導させ、抗原ペプチドを添加する。

[施行場所]

細胞プロセッシング研究部門、臨床細胞工学室バイオハザードルーム (P3)

[必要物品・機材リスト]

製品名	会社名； 製品番号 ¹⁾	製造 番号 ²⁾	消費 期限	確認者 署名
50 ml コニカルチューブ	Falcon; 2070	2224233		
RPMI-1640	Hy Clone; SH30313.01	AMJ17230	2003/9	
ヒト AB 型血清 (非働化済み)	COSMO BIO; KOJ813-10	01047		
Antibiotic-Antimycotic	GIBCO BRL; 15240-062	1148352	2003/9	
TNF- α	PeptoTech; 300-01B			
ペプチド (Gag28)	Multiple Peptide Systems			
ペプチド (Gag28 (3R))	Multiple Peptide Systems			
ペプチド (Gag296)	Multiple Peptide Systems			
ペプチド (Nef138)	Multiple Peptide Systems			
ペプチド (Nef138 (2F))	Multiple Peptide Systems			
ペプチド (Env584)	Multiple Peptide Systems			
ペプチド (Env584 (4Q))	Multiple Peptide Systems			
クライオチューブ	Falcon; 2817			
ピペット 25 ml	Falcon; 6535	2241868		
ピペット 10 ml	Falcon; 6551	2238780		
ピペット 5 ml	Falcon; 6543	226701		
ピペット 2 ml	Falcon; 6507	2294269		
ピペット 1 ml	Falcon; 7522			
マイクロペット用チップ 1000	Greiner bio-one; 740288			
マイクロペット用チップ 200	Greiner bio-one; 739228	71207839	2002/6/20 (製造)	
マイクロペット用チップ 20	Greiner bio-one; 774288			
消毒用アルコール綿 (イタコット)	健栄製薬株式会社	2050	2005/11	
プラスチック手袋 (7)	Allegiance; 2D7243I	PS02N063	2007/6/30	
プラスチック手袋 (61/2)	Allegiance; 2D7242I	PS02N062	2007/6/30	
Fluid Shield Surgery Mask	Kimberly-Clark; 47137	2D067452		
培養用ディッシュ (10cm)	Falcon; 3803			
血球計算板	KOVA; 87144			
Trypan Blue	GIBCO BRL; 15250-61	1144897	2003/09	
マイクロピペッター	Gilson			

ピペットエイド	Falcon	16660		
マイクロピペッター	Gilson			
倒立顕微鏡	OLYMPUS; CK40	2H08706		
遠心機	Tomy; RLX-135			
CO2 インキュベータ	FORMA; 3110 S/N 26520-1979			
安全キャビネット	SANYO; MHE-130B1	600015		
-150℃ディープフリーザー	SANYO; MDF-1155AT	010047		
4℃冷蔵庫	SANYO; MPR-311D	600823		
ボルテックス	ヤマト; タッチミキサーMT-31	40900075		
ヒートブロック	旭テクノグラス ALB-121			
マイクロチューブ遠心機	TOMY; PMC-060			

1) またはコード番号など、2) またはロット番号など

[手技]

- 1 TNF- α 溶液 ((2)-4 参照) を必要な本数取りだし、解凍した後マイクロチューブ遠心機でフラッシュする。
- 2 各培養ディッシュに TNF- α 溶液 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 10 μl 加え (培養液 10 ml、最終濃度 50 ng/ml)、緩やかに攪拌する。
- 3 フリーザーから 7 種類のペプチド (Gag28, Gag28 (3R), Gag296, Nef138, Nef138 (2F), Env584, Env584 (4Q)) の 1 mM ストック溶液 ((2)-6 参照) を取り出し解凍した後、マイクロチューブ遠心機でフラッシュする。
- 4 培養ディッシュに各ペプチド 1 mM ストック溶液を、1 種類ずつ 100 μl 加え緩やかに攪拌する。ディッシュにペプチド名を記載する。
- 5 インキュベータで 16~24 時間培養。

平成 年 月 日

患者名:

患者 ID 番号:

登録番号:

実施者の署名: _____

確認者の署名: _____

責任医師名の署名: _____

参考資料 4

(7-6) 成熟樹状細胞の回収 (第6回目)

[目的]

(6) で誘導し、抗原ペプチドを添加した成熟樹状細胞を回収する。

[施行場所]

細胞プロセッシング研究部門、臨床細胞工学室バイオハザードルーム (P3)

[必要物品・機材リスト]

製品名	会社名 ; 製品番号 ¹⁾	製造 番号 ²⁾	消費 期限	確認者 署名
50 ml コニカルチューブ	Falcon; 2070	2224233		
18G 注射針	テルモ; TB-A400L	020917A	2007/08	
50 ml 注射器	テルモ	021226E	2007/11	
ピペット 25 ml	Falcon; 6535	2241868		
ピペット 10 ml	Falcon; 6551	2238780		
ピペット 5 ml	Falcon; 6543	2266701		
ピペット 2 ml	Falcon; 6507	2294269		
ピペット 1 ml	Falcon; 7522			
マイクロピペット用チップ 1000	Greiner bio-one; 740288			
マイクロピペット用チップ 200	Greiner bio-one; 739228			
マイクロピペット用チップ 20	Greiner bio-one; 774288			
消毒用アルコール綿 (イタコト)	健栄製薬株式会社	2050	2005/11	
プラスチック手袋 (7)	Allegiance; 2D7243I	PS02N063	2007/6/30	
プラスチック手袋 (61/2)	Allegiance; 2D7242I	PS02N062	2007/6/30	
Fluid Shield Surgery Mask	Kimberly-Clark; 47137	2D067452		
セルスクレーパー	Greiner;			
大塚生食	大塚製薬株式会社	2J71N	2007/10	
血球計算板	KOVA; 87144			
Trypan Blue	GIBCO BRL; 15250-61	1144897	2003/09	
マイクロピペッター	Gilson			
ピペットエイド	Falcon	16660		
マイクロピペッター	Gilson			
倒立顕微鏡	OLYMPUS; CK40	2H08706		
遠心機	Tomy; RLX-135			
CO2 インキュベータ	FORMA; 3110 S/N 26520-1979			
安全キャビネット	SANYO; MHE-130B1	600015		
-150℃ディープフリーザー	SANYO; MDF-1155AT	010047		
4℃冷蔵庫	SANYO; MPR-311D	600823		
ボルテックス	ヤマト; タッチミキサーMT-31	40900075		
ヒートブロック	旭テクノグラス ALB-121			
マイクロチューブ遠心機	TOMY; PMC-060			

1) またはコード番号など、2) またはロット番号など

[手技]

- 1 50 ml コニカルチューブを 7 本用意し、ペプチド名を記載する。250ml のストレージボトルに「培養液」とラベルする。
- 2 培養ディッシュをインキュベータから取り出し、培養液をピペットで回収し、ペプチドごとに 50ml チューブに移す。
- 3 ディッシュに生理食塩水 6 ml を加え、セルスクレーパーでディッシュの辺縁部を最低 4 周するようにして細胞をはがし、その後 1 往復スクレーパーで行き来させる。ディッシュを 90° 回転させて、同様に再度細胞をはがす。上清を手順 2 で培養液を入れたのと同じ 50ml チューブに移す。剥がれ具合は顕微鏡で確認する。
- 4 再び、ディッシュに生理食塩水 6 ml を加えて洗浄し、顕微鏡で確認して剥がれ残りがある場合は手順 3 を繰り返す。上清を手順 2 で培養液を入れたのと同じ 50ml チューブに移す。
- 5 1500 rpm、5 分、4℃ (加速：最大、減速：最大) で遠心。
- 6 上清をピペットで吸引し、「培養液」とラベルしたボトルに移す。「培養液」とラベルしたボトルから、4 本のアシストチューブにその 1 ml を移し、このうちの 2 本をマイコプラズマ・一般細菌・真菌検査、エンドトキシン・ β -D-glucan 測定、HIV RNA 測定用として SRL 社に提出し (ステップ 3)、残りの 2 本はバックアップとして臨床細胞工学室バイオハザードルーム (P3) 内の -150℃ディープフリーザーに保管する。SRL 社に提出するアシストチューブには患者氏名の記載のないラベルを貼る。検査結果は本標準手技の巻末に貼付し、症例記録用紙 CRF Form 4 の 6 に記載する。
- 7 手順 5 で遠心したコニカルチューブはすべてタッピングでペレットを崩し、生理食塩水 10 ml を入れペレットを懸濁した後、1500 rpm、5 分、4℃ (加速：最大、減速：最大) で遠心。
- 8 上清を吸引ピペットで吸引・破棄し、ペレットをタッピングで崩し、生理食塩水 10 ml を 1 本目のチューブに加えペレットを懸濁し次のチューブに移す。これを順次繰り返し、7 本を 1 本にまとめる。新しい生理食塩水 10ml を 1 本目に加え同じ操作を繰り返し、計 20ml の細胞浮遊液とする。
- 9 1500 rpm、5 分、4℃ (加速：最大、減速：最大) で遠心。

参考資料 4

- 10 上清を吸引・破棄し、ペレットをタッピングで崩し、生理食塩水を 1.0 ml 加えて細胞を浮遊させる。
- 11 ここから 10 μ l をアシストチューブに移し PBS で希釈したのち、trypan blue を同量加え、血球計算板で細胞数および生細胞率を求め、症例記録用紙 CRF Form 11 に記録する。
- 12 細胞濃度を 1.0×10^7 /ml に調整し、ツベルクリン注射器で 1 ml を吸い氷上にて搬送する。細胞数が 1×10^7 に満たないときは、表面抗原解析に用いる細胞をのぞいた全量を接種する。
- 13 50 ml コニカルチューブに残った細胞は、樹状細胞の表面抗原解析 (CD80, CD86, MHC class I, MHC class II) に用いる (症例記録用紙 CRF Form 11 に記入する)。

平成 年 月 日

患者名：

患者 ID 番号：

登録番号：

実施者の署名： _____

確認者の署名： _____

責任医師名の署名： _____

(8-6) 被験者への成熟樹状細胞接種 (第6回目)

[目的]

ペプチド添加樹状細胞を接種する。

[施行場所]

医科学研究所附属病院外来または病室

[必要物品・機材リスト]

製品名	会社名； 製品番号 ¹⁾	製造 番号 ²⁾	消費 期限	確認者 署名
ツベルクリン用注射器	テルモ			
消毒用アルコール綿 (エタコット)	健栄製薬株式会社	2050	2005/11	
プラスチック手袋 (S)	井内盛栄堂； 6-906-03	PS02N063	2007/6/30	
プラスチック手袋 (M)	井内盛栄堂； 6-906-02	PS02N062	2007/6/30	

1) またはコード番号など、2) またはロット番号など

[手技]

- 1 氷上で搬送されたツベルクリン用注射器 を上下に転倒させ、細胞を均一に浮遊させる。
- 2 被験者の腋窩近くの上腕内側または鼠径部近くの大腿内側いずれか1ヶ所の皮膚を70%エタノールに浸潤した清潔綿で消毒し、樹状細胞液を浅い皮下に接種する。

平成 年 月 日

患者名：

患者 ID 番号：

登録番号：

実施者の署名： _____

確認者の署名： _____

責任医師名の署名： _____

参考資料 4

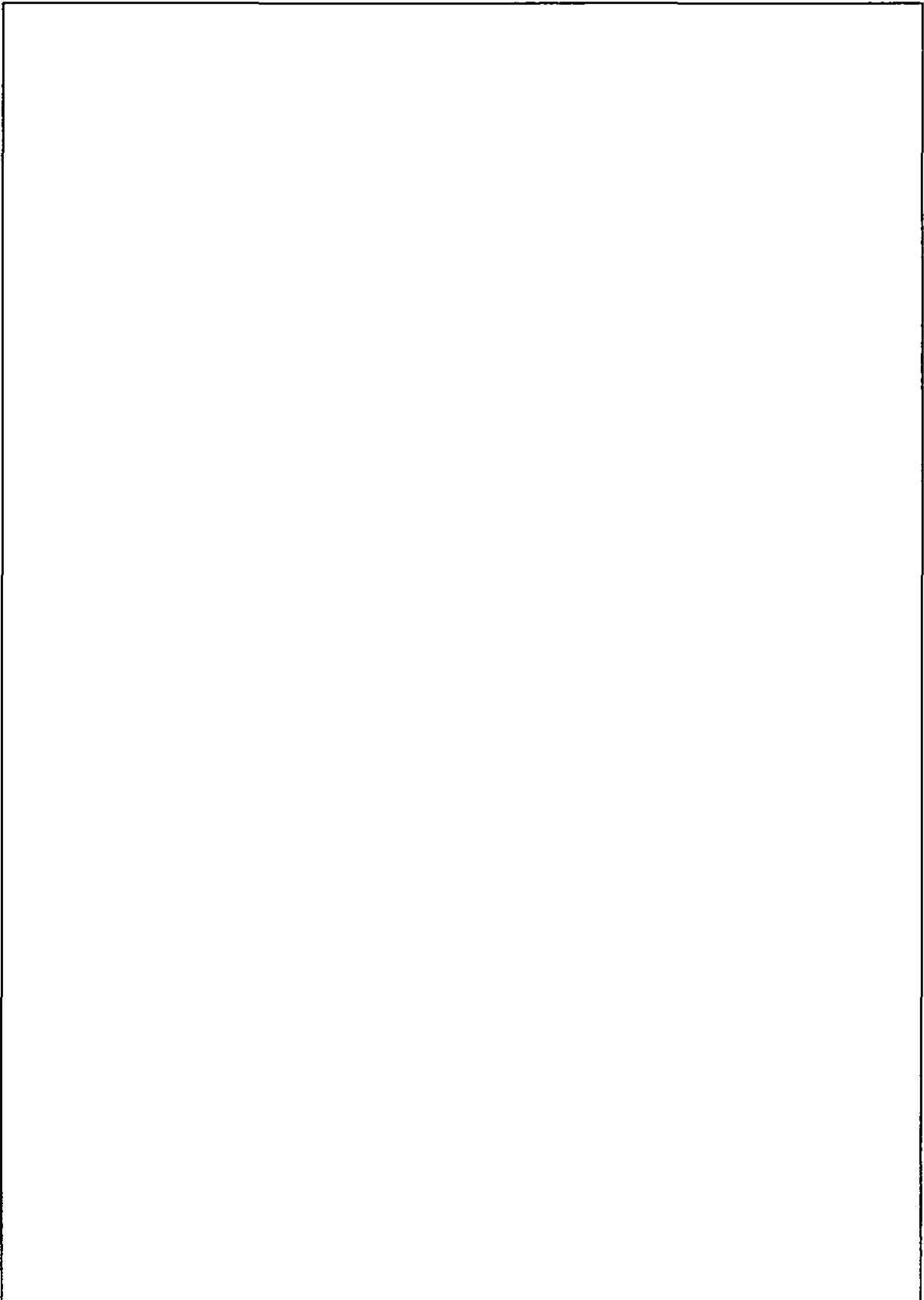
C. 必要物品・機材リストの一覧と保管条件

製品名	会社名；製品番号	保管条件
コーブスペクトラ用 WBC セット	GAMBRO BCT; 777-006-000	室温
操作アダプター	テルモ; TC-MP	室温
分離バッグ 600ml	テルモ; BB-T060CJ	室温
50 ml 注射器	テルモ; SS-50ESZ	室温
ツベルクリン用注射器	テルモ	室温
18G 注射針	テルモ; TB-A400L	室温
ハッピーキャス	メディキット;	室温
クイントンカテーテル	Kendall	室温
クライオチューブ	Falcon; 2817	室温
セルスクレーパー	Falcon; 3085	室温
アシストチューブ	アシスト; 72.694.0065	室温
血球計算板	KOVA; 87144	室温
15 ml コニカルチューブ	Iwaki; 2314-015	室温
50 ml コニカルチューブ	Falcon; 2070	室温
培養用ディッシュ (10cm)	Falcon; 3803	室温
ピペット 25 ml	Falcon; 6535	室温
ピペット 10 ml	Falcon; 6551	室温
ピペット 5 ml	Falcon; 6543	室温
ピペット 2 ml	Falcon; 6507	室温
ピペット 1 ml	Falcon; 7522	室温
マイクピペット用チップ 1000	Greiner bio-one; 740288	室温
マイクピペット用チップ 200	Greiner bio-one; 739228	室温
マイクピペット用チップ 20	Greiner bio-one; 774288	室温
消毒用アルコール綿 (エタコト)	健栄製薬株式会社	室温
プラスチック手袋 (S)	井内盛栄堂; 6-906-03	室温
プラスチック手袋 (M)	井内盛栄堂; 6-906-02	室温
Fluid Shield Surgery Mask	Kimbery-clark; 4713	室温
Ficoll-Plaque Plus	Amersham Pharmacia Biotech; 14-1440-02	4℃
ダルベッコズ 燐酸緩衝塩 (PBS)	Hy Clone; SH30028.02	4℃
RPMI-1640	Hy Clone; SH30313.01	4℃
Antibiotic-Antimycotic	GIBCO BRL; 15240-062	4℃
ヒト AB 型血清 (非働化済み)	COSMO BIO; KOJ813-10	4℃
Antibiotic-Antimycotic	GIBCO BRL; 15240-062	4℃
GM-CSF	PeproTech; 300-03	-30℃以下
インターロイキン 4	PeproTech; 200-04	-30℃以下
TNF-α	PeproTech; 300-01B	-30℃以下
大塚蒸留水	大塚製薬株式会社	室温
大塚生食	大塚製薬株式会社	室温
DMSO	Sigma; D2650	室温
生理食塩水 1000ml	テルモ;	室温
ACD-A 液 500ml	テルモ;	室温
ヘパリン 5000 単位/5ml	持田薬品;	室温
ペプチド (Gag28)	Multiple Peptide Systems	室温
ペプチド (Gag296)	Multiple Peptide Systems	室温
ペプチド (Nef138)	Multiple Peptide Systems	室温
ペプチド (Nef138 (2F))	Multiple Peptide Systems	室温

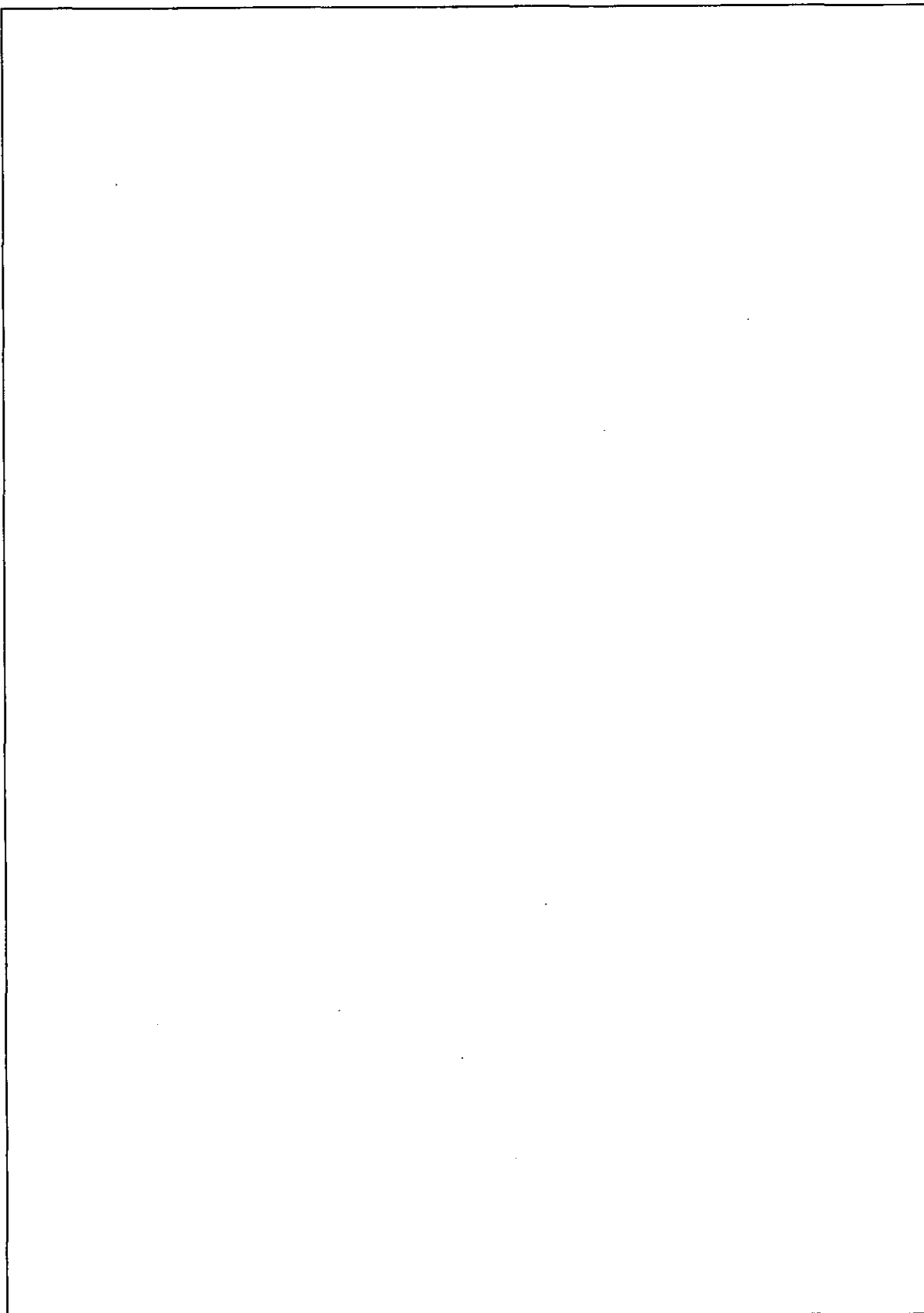
ペプチド (Env584)	Multiple Peptide Systems	室温
ペプチド (Env584 (4Q))	Multiple Peptide Systems	室温
Trypan Blue	GIBCO BRL; 15250-61	室温
ピペットエイド	Falcon	室温
Bicell	Nihon Freezer Co.	室温
マイクロピペッター	Gilson	室温
倒立顕微鏡	ニコン TS-100	室温
遠心機	Tomy; BS-325	室温
CO2 インキュベータ	FORMA; 3110 S/N 26520-1979	室温
安全キャビネット	SANYO; MHE-130B1	室温
-150℃ディープフリーザー	SANYO; MDF-1155AT	室温
4℃冷蔵庫	SANYO; MPR-311D	室温
ポルテックス	ヤマト; タッチミキサーMT-31	室温
ヒートブロック	旭テクノグラス ALB-121	室温
マイクロチューブ遠心機	TOMY; PMC-060	室温

D. 細菌培養等の安全性試験の結果

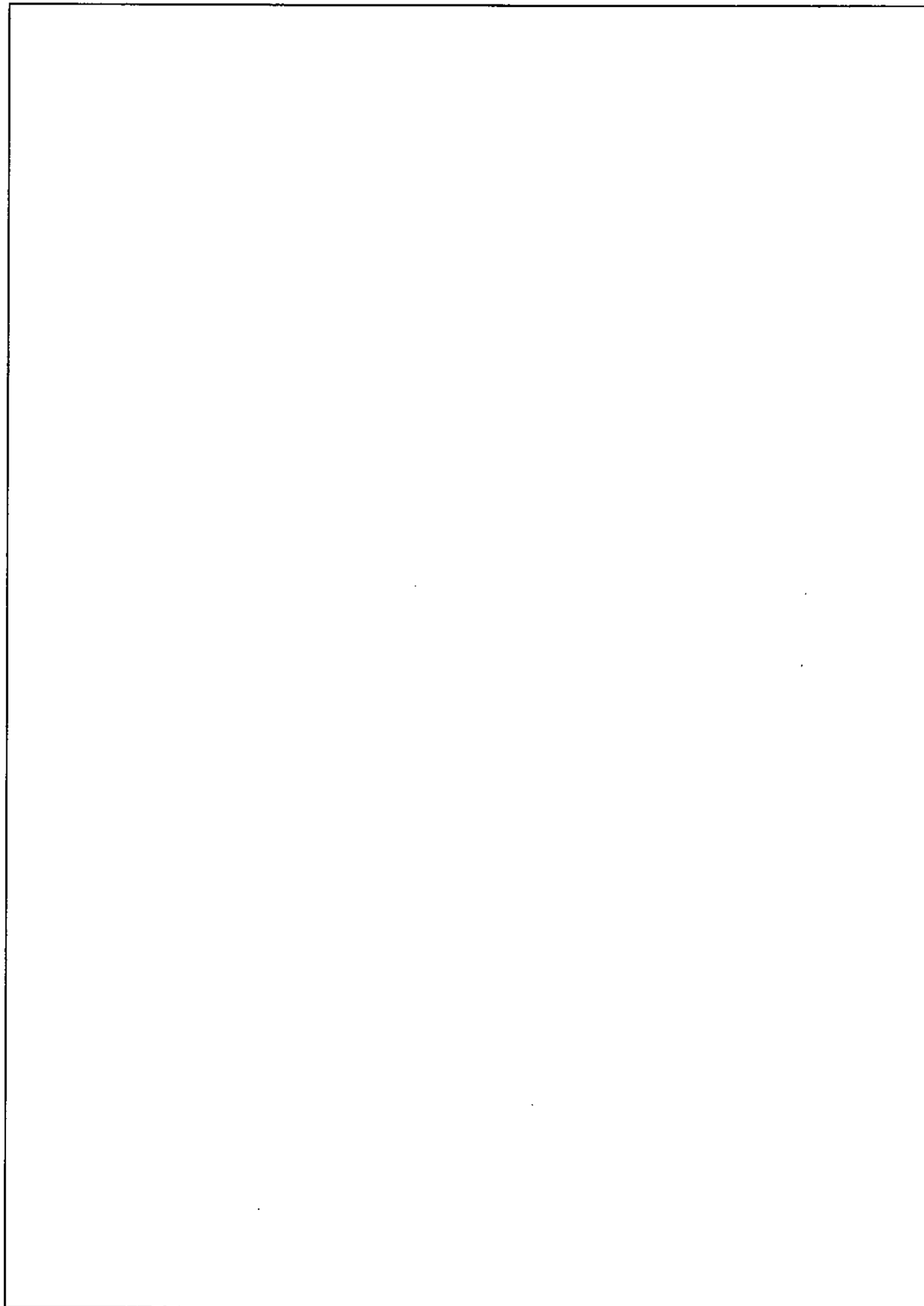
(1) ステップ 1 (RPMI ; 7 ページ; (2) -1)



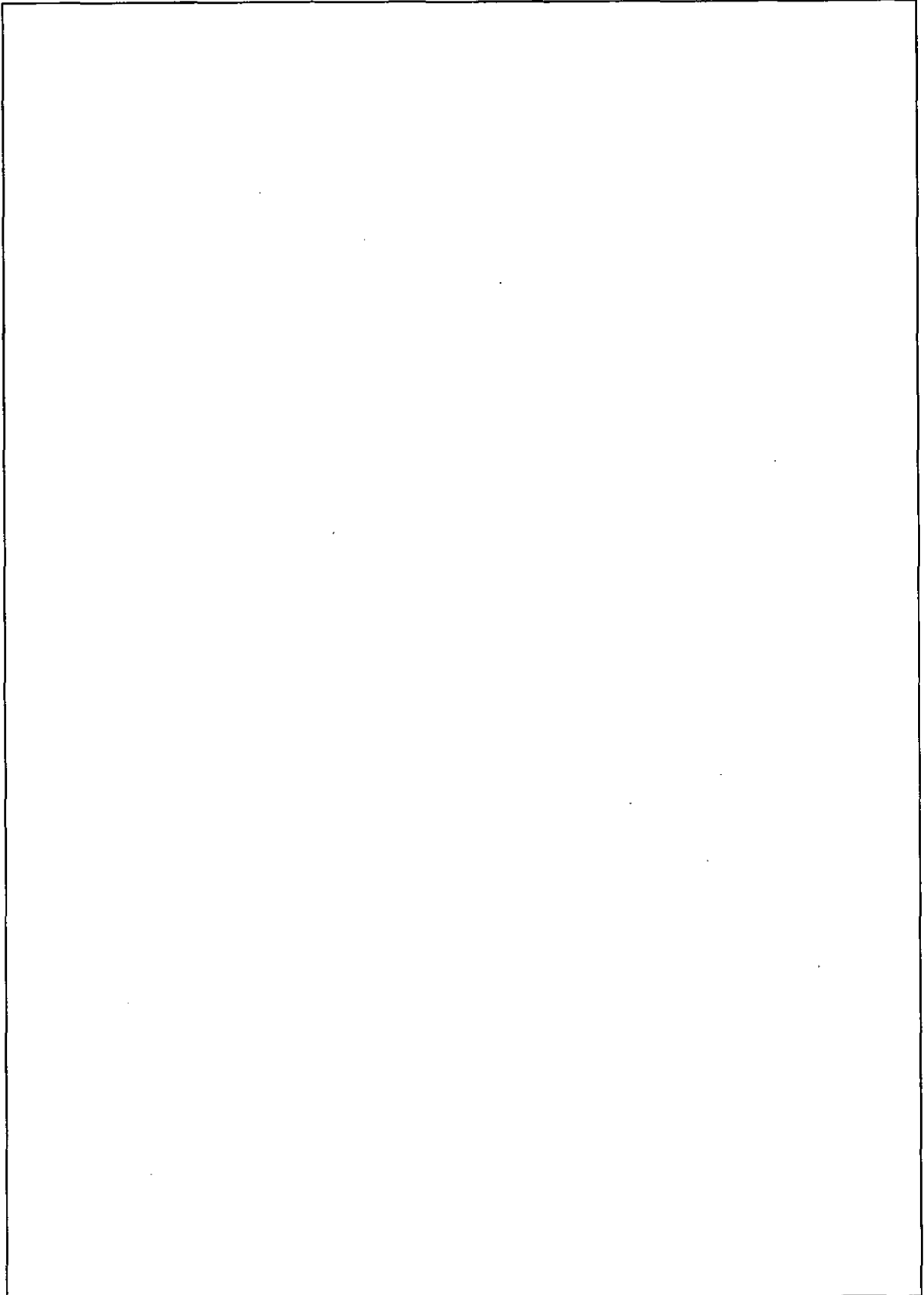
(2) ステップ 2 (単核球 ; 15 ページ ; (4)-16)



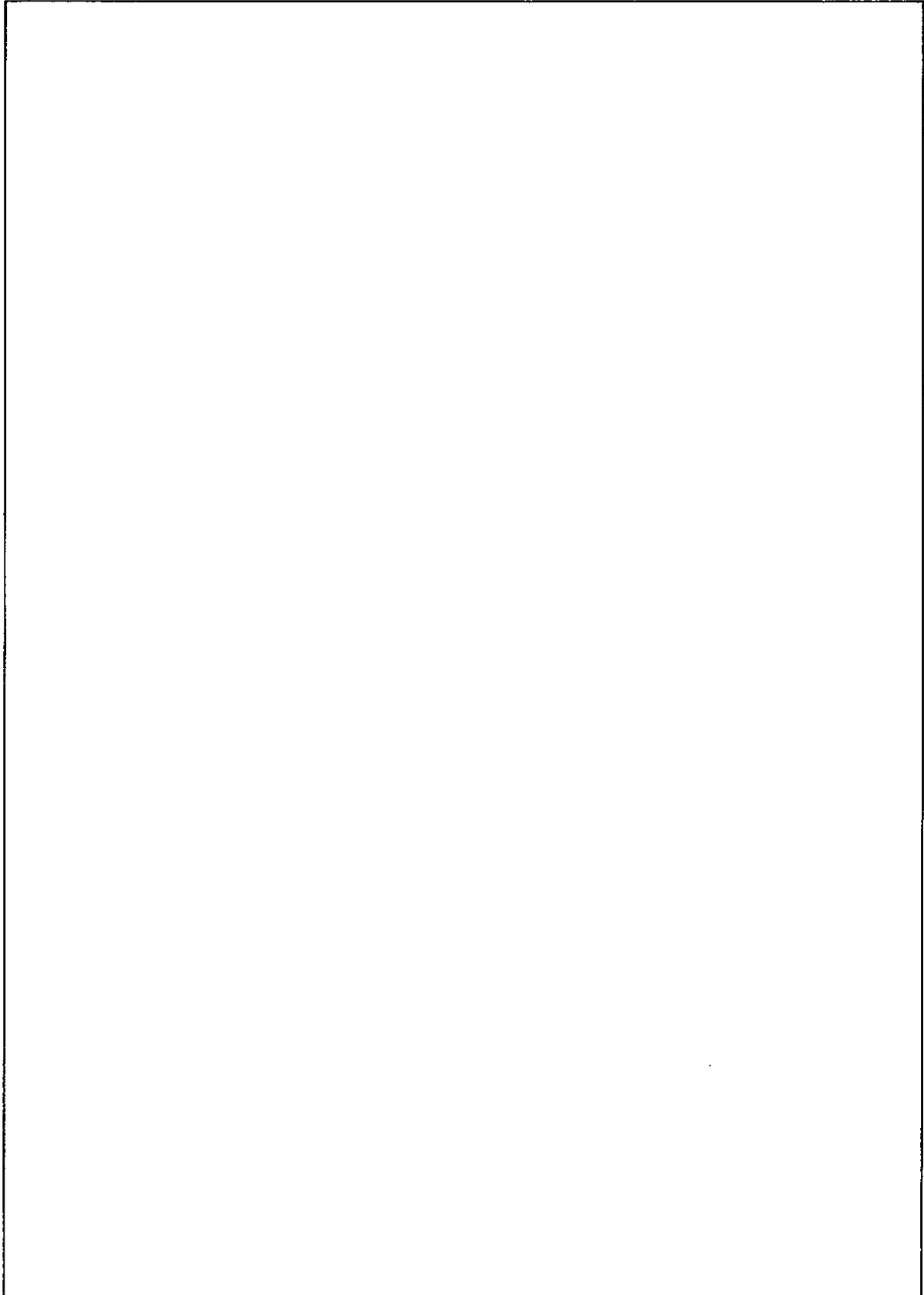
(3-1) ステップ 3 (成熟樹状細胞、第 1 回目)



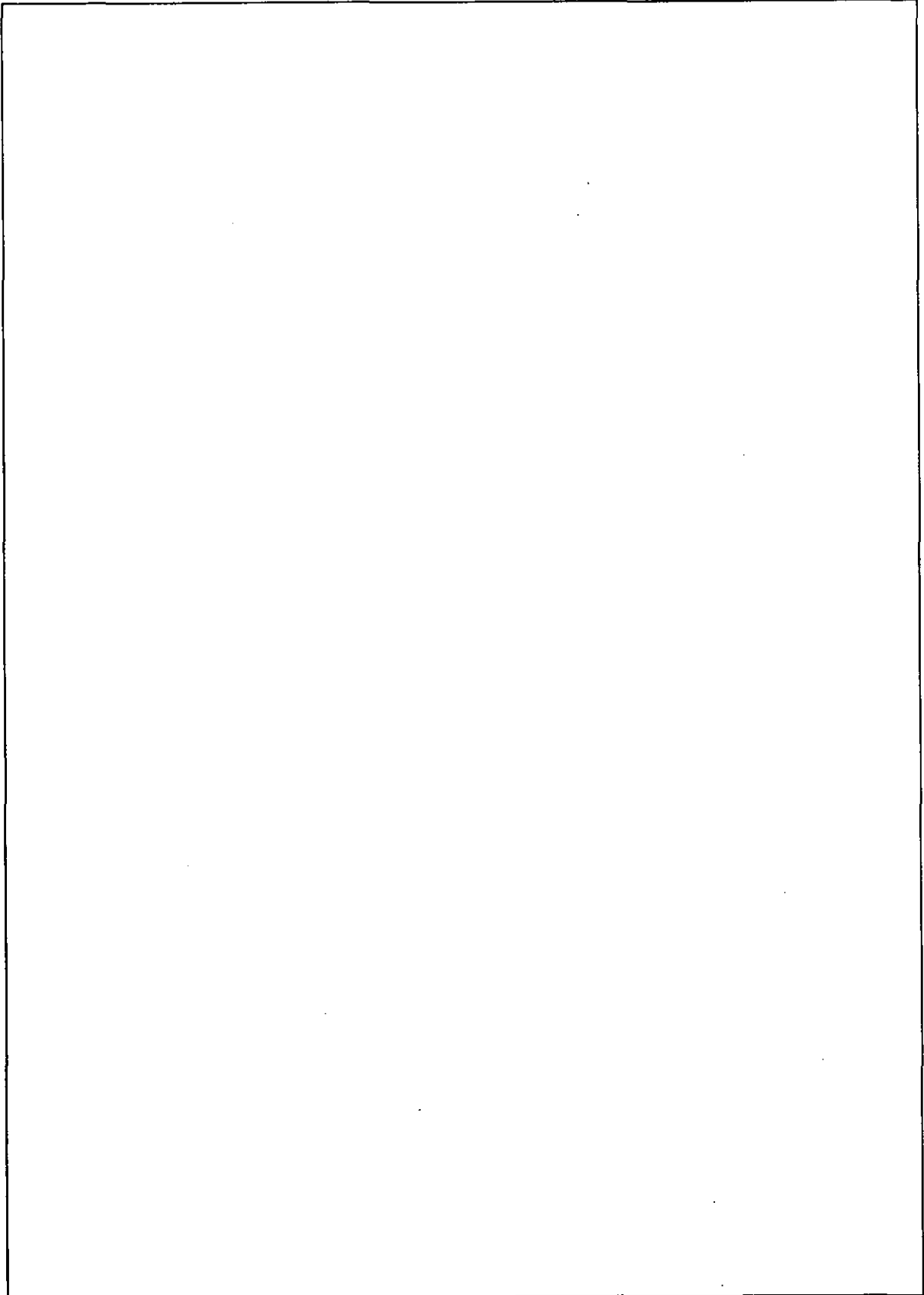
(3-2) ステップ 3 (成熟樹状細胞、第2回目)



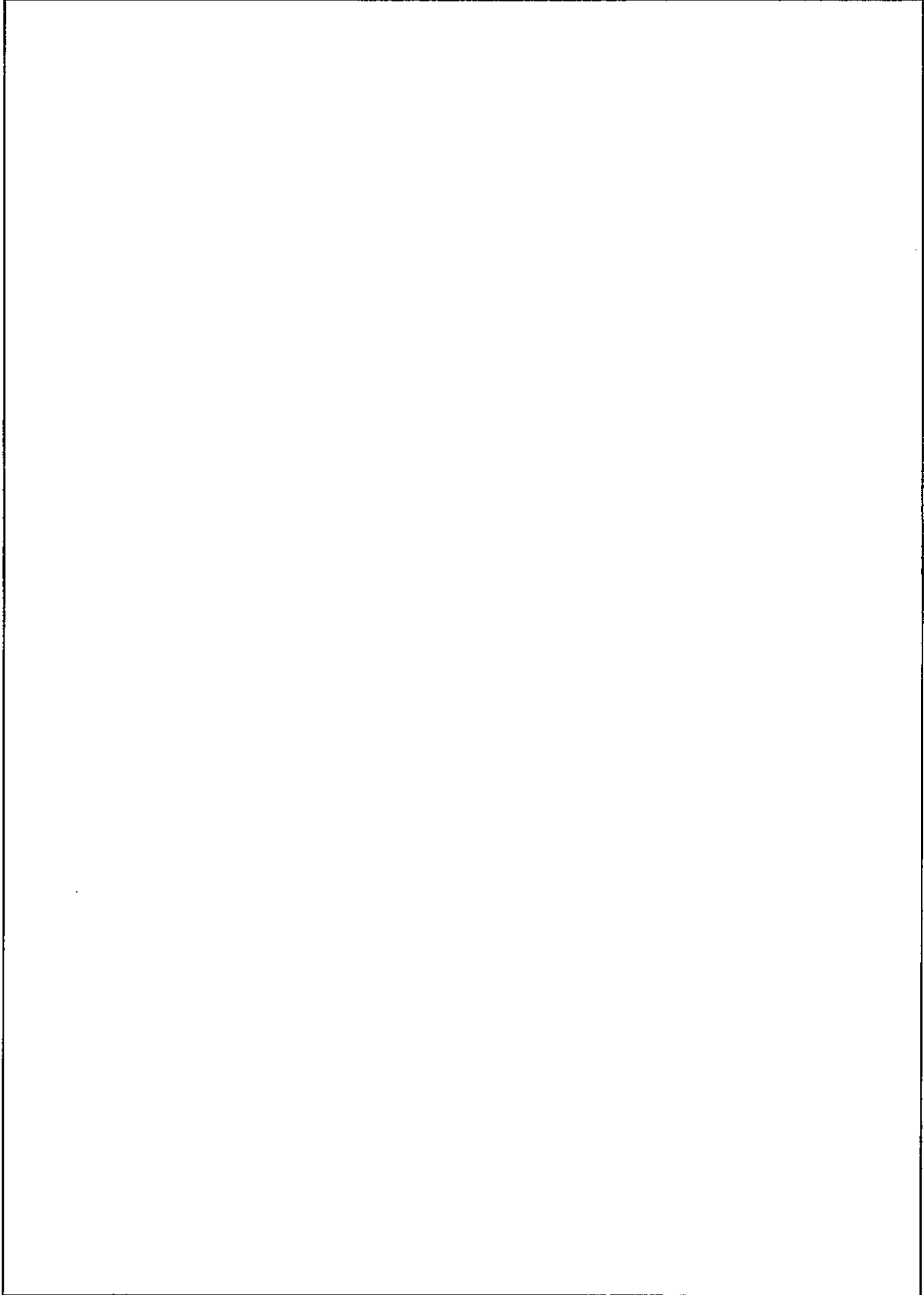
(3-3) ステップ 3 (成熟樹状細胞、第 3 回目)



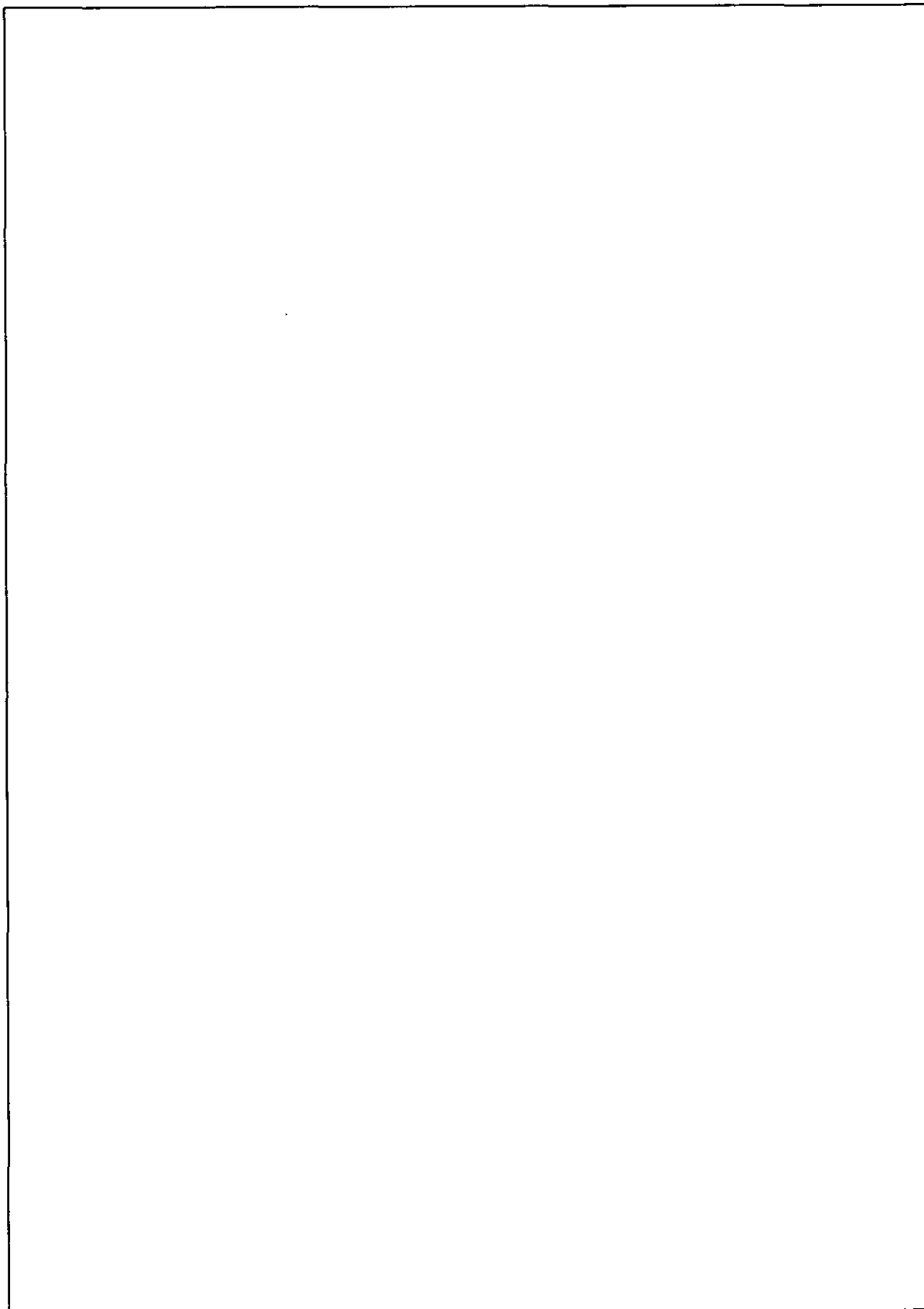
(3-4) ステップ 3 (成熟樹状細胞、第 4 回目)



(3-5) ステップ 3 (成熟樹状細胞、第 5 回目)



(3-6) ステップ 3 (成熟樹状細胞, 第6回目)



E. 作業工程予定表

第 1 回接種用

年	月	日
---	---	---

アフエレーシス
単核球分離、凍結
TRC にスケジュールを連絡

Day 1	年	月	日
-------	---	---	---

単核球解凍
付着 30 分間 (RPMI)
付着 12~24 時間 (完全培地)

Day 2	年	月	日
-------	---	---	---

GM-CSF、IL4 入り完全培地、7 日間
培養

Day 9	年	月	日
-------	---	---	---

TNF α 添加、24 時間培養

Day 10	年	月
--------	---	---

ペプチド添加、12~16 時間培養

Day 11	年	月
--------	---	---

細胞回収
表面抗原解析
患者への接種

第 2 回接種用

年	月	日
---	---	---

アフエレーシス
単核球分離、凍結
TRC にスケジュールを連絡

Day 1	年	月	日
-------	---	---	---

単核球解凍
付着 30 分間 (RPMI)
付着 12~24 時間 (完全培地)

Day 2	年	月	日
-------	---	---	---

GM-CSF、IL4 入り完全培地、7 日間
培養

Day 9	年	月	日
-------	---	---	---

TNF α 添加、24 時間培養

Day 10	年	月
--------	---	---

ペプチド添加、12~16 時間培養

Day 11	年	月
--------	---	---

細胞回収
表面抗原解析
患者への接種