

200401176A

厚生労働科学研究研究費補助金  
医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

癌免疫細胞療法における凍結血漿の使用に関する調査研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

平成17年（2005）年4月

主任研究者 岡 正 朗

# 目次

I. 総括研究報告	
癌免疫細胞療法における凍結血漿の使用に関する調査研究に関する研究	1
II. 分担研究報告	
1. 東京都における免疫細胞療法の現状に関する研究	4
有賀 淳	
2. 癌免疫細胞療法における凍結血漿の使用に関する研究	5
山口佳之	
3. 癌免疫細胞療法における凍結血漿の使用に関する研究	8
片野光男	
4. 癌免疫細胞療法における凍結結晶の使用に関する研究	10
上田祐二	
5. 癌免疫細胞療法における凍結血漿の使用に関する研究	13
谷 眞至	
6. 癌免疫細胞療法における凍結結晶の使用に関する研究	15
河野浩二	
7. 抗原特異的 T リンパ球並びに NKT 細胞培養において、ヒト血清添加が与える影響 の検討に関する研究	16
平家勇司	
8. 癌免疫細胞療法における凍結血漿の使用に関する調査研究	18
裕 彰一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	20
IV. 研究成果の刊行物・別刷	27

研究要旨：本研究では、癌の細胞療法において、特に民間での細胞誘導に大量の FFP が使用されており、社会的問題となっている。今回、癌細胞療法での細胞誘導に FFP が必要であるかについて、FFP の使用状況を研究施設で調査したところ、アンケート調査を行う共に、細胞誘導に FFP

分担研究者氏名・所属施設及び所属施設における職名

有賀 淳 東京女子医大がん免疫細胞治療学・教授  
山口佳之 広島大学原医研外科・講師  
片野光男 九州大学大学院外科学腫瘍制御学・教授  
上田祐二 京都府立医大消化器外科・講師  
谷 眞至 和歌山県立医科大学第 2 外科・講師  
河野浩二 山梨大学第 1 外科・助教授  
平家勇司 国立がんセンター薬効試験部・主任研究官  
裕 彰一 山口大学第 2 外科・講師

A. 研究目的

細胞免疫療法に使用される免疫細胞においても医薬品としての安全性・有効性の確保はきわめて重要な課題である。なかでも、培養時の添加物として輸血製剤である凍結血漿を使用している施設があり、凍結血漿はヒトからの供給によるため、緊急時の供給量の確保や未知の感染症、免疫反応等の問題を内在しており、細胞培養時の使用は献血者に対する倫理性、投与患者に対する安全性の面から問題となっている。

本研究では、本邦における細胞免疫療法の現状について調査するとともに、各種細胞培養法による抗腫瘍活性誘導効率を検討することにより、凍結血漿の不必要性を証明することを目的とした。

B. 研究方法

まず、1年間で細胞療法を行っている施設のアンケート調査を行い、凍結血漿の使用状況を把握すると共に、FFP によると思われる有害事象について調査する。また、基礎研究において細胞培養において、凍結血漿の使用の必要性について確認することを目的とした。

（倫理面への配慮）

今回本研究に参加する施設では、癌細胞免疫療法をすでに倫理委員会承認の下に臨床応用しており、患者に対するインフォームドコンセントも整備されている。この治療にあわせて本研究を推進できる。また、アンケート調査や実地調査に関しても各施設の情報は一般に公開することはない。したがって、本研究は倫理面においてなんら問題がないと考えられる。

C. 研究結果

細胞培養条件では、各施設で現在使用されているメディウムならびに血清成分、細胞培養における血清成分の必要性、GMP grade の細胞誘導を行うにあたり越えるべき問題点、などを検討し、何らかの血清成分は必要であるが、FFP 以外のもので代用できる可能性が示唆された。班員の施設ならびに筑波大学の 9 施設中で FFP を使用しているのは 1 施設のみであり、FP の不必要性が強く示唆された。

民間細胞療法の調査に関しては、アンケート調査方法等について問題提起と具体的調査方法を検討した。また、全国で民間細胞療法を行ってい

る施設名が、35 施設リストアップされた。

#### D. 考察

細胞誘導条件の検討では、患者血清では誘導不良例があるとの意見から患者血清と健常者血清は両者を必ず使用して比較検討することなどを取り決め、班員各施設において FFP の不要性を裏付けるデータを収集することが取り決められた。

民間細胞療法の調査に関しては、患者負担の自由診療を行っている民間施設に対するアンケート調査は回収率が極めて悪く（現状は0%）、困難が予想され、トラブルのもととなりかねないことなどから、今後はインターネット、学会発表の抄録などから施設名、連絡先などを各班員がそれぞれの調査分担地域について検索し、事務局が一括してアンケートを行うこととなった。

#### E. 結論(ならびに今後の研究方針)

本年度の研究・調査により、細胞誘導条件では、各施設で現在使用されているメEDIUMならびに血清成分、細胞培養における血清成分の必要性、GMP grade の細胞誘導を行うにあたり越えるべき問題点、などを検討した。その結果、何らかの血清成分は必要であるが、FFP 以外のもので代用できる可能性が示唆された。

来年度は、細胞誘導条件の検討では、血清・血漿の必要性を再確認すること、誘導細胞は樹状細胞とリンパ球に限定すること、培養液を RPMI1640 などの無血清タイプとするか、AIM-V などの蛋白含有タイプとするかは各施設の事情に合わせることを、FFP, AB serum のいずれを用いるかは各施設の事情に合わせるが、患者血清では誘導不良例があるとの意見から患者血清と健常者血清は両者を必ず使用して比較検討することなどを取り決め、班員各施設において FFP の不要性を裏付けるデータを収集し、確定的な結果を導くことが取り決められた。

民間細胞療法の調査に関しては、アンケート調査方法等について問題提起と具体的調査方法を検討した。また、全国で民間細胞療法を行っている施設名が、35 施設リストアップされた。

患者負担の自由診療を行っている民間施設に対するアンケート調査は回収率が極めて悪く（現状は0%）、困難が予想されること、並びに班員個々に調査するのは効率が悪いだけでなく、トラブルのもととなりかねないことなどから、民間細胞療法を行っている施設の調査は、インターネット、学会発表の抄録などから施設名、連絡先などを各班員がそれぞれの調査分担地域について検索し、事務局に報告する。アンケート用紙の送付は事務局（山口大学）が行うこととなった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamamoto K, Mine T, Katagiri K, Suzuki N, Kawaoka T, Ueno T, Matsuda S, Yamada A, Itho K, Yamana H, Oka M. Immunological evaluation of personalized peptide vaccination for patients with pancreatic cancer. *Oncol Rep*, in press

Matoba K, Iizuka N, Gondo T, Ishihara T, Okabe H, Tamesa T, Takemoto N, Hoshimoto K, Sakamoto K, Miyamoto T, Uchimura S, Hamamoto Y, Oka M. Tumor HLA-DR expression linked to early hepatic recurrence of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 115(2):231-240, 2005

Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, Iizuka N, Toda T, Nishisaka T, Oka M, Nakamura K. Overexpression of alpha enolase in poorly differentiated hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection. *Proteomics*. [Epub ahead of print], 2005

Araki A, Hazama S, Yoshimura K, Oka M. High IL-15 secreting tumour induces specific immunity through CD8+ T cells to low immunogenic colon Adenocarcinoma. *Int J*

Mol Med. 14(1):571-576, 2004

## 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

MHC class II 発現低下と肝細胞癌における術後肝内再発. 飯塚徳男, 的場勝弘, 権藤俊一, 岡部尚文, 為佐卓夫, 恒富亮一, 裕彰一, 浜本義彦, 岡正朗. 日本癌治療学会 39 巻 2 号 Page636 (2004.09)

癌に対する個別化治療(食道・胃) Lentinan と各種免疫担当細胞結合様式の検討. 近藤浩史, 裕彰一, 吉野茂文, 佐野昭子, 丹黒章, 須賀哲也, 須賀泰世, 岡正朗. 日本癌治療学会誌 39 巻 2 号 Page464(2004.09)

遺伝子治療 腫瘍特異的発現 vector を用いた癌免疫遺伝子治療の基礎的検討. 東幸助, 裕彰一, 飯塚徳男, 丹黒章, 野間隆文, 岡正朗. 日本癌治療学会誌 39 巻 2 号 Page397(2004.09)

癌に対する Cell therapy 切除可能膵癌に対する MUC1-CTL 療法:河岡徹, 山本光太郎, 吉野茂文, 裕彰一, 丹黒章, 岡正朗. 日本癌治療学会誌 39 巻

2号 Page358(2004.09)

膵癌に対する MUC1-CTL を用いた術後補助免疫療法:河岡徹(山口大学 第2 外科), 山本光太郎, 吉野茂文, 裕彰一, 丹黒章, 岡正朗. 日本消化器外科学会雑誌 37 巻 7号 Page1120(2004.07)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

## 1. 特許取得

なし

## 分担研究報告書

東京都における免疫細胞療法の現状に関する研究

(分担) 研究者 有賀 淳 東京女子医科大学大学院教授

### 研究要旨

東京都において癌の治療目的にて免疫細胞療法を実施している施設及び細胞培養状況を調査し、免疫細胞療法における血漿（血清）使用の必要性を検討した。

#### A. 研究目的

東京都における癌に対する免疫細胞療法の実施状況及び免疫細胞培養時の血漿（血清）使用状況を明らかにし、免疫細胞療法における血漿（血清）使用の必要性を検討した。

#### B. 研究方法

図書、雑誌、インターネット、公表資料等の検索及び各施設へのアンケート調査を行い、免疫細胞療法の実施内容と細胞培養における血漿（血清）の利用状況について調査した。

（倫理面への配慮）

個々の医療施設の調査結果解析において施設名を公表しないこととした。

#### C. 研究結果

東京都内で大学病院 6 施設、民間クリニック 21 施設で癌に対する免疫細胞療法が実施されていた。免疫細胞療法の内訳は活性化リンパ球の利用が 25 施設、樹状細胞の利用が 6 施設であった（重複あり）。培養方法が確認できた施設において、細胞培養には無血清培養液もしくは自己血漿添加培養液を使用しており、凍結血漿(FFP)や他人の血清を使用している施設は認めなかった（ただし過去に使用した経験のある施設はあり）。

#### D. 考察

癌に対する免疫細胞療法は東京都において 27 施設で実施されていることが確認された。現時点で凍結血漿(FFP)や他人の血清を使用している施設は調査範囲内では認められず、無血清培養液単独もしくは自己血漿添加培養液にて免疫細胞療法用の細胞培養が可能であると考えられた。

#### E. 結論

癌に対する免疫細胞療法は東京都では広く普及した医療になりつつあり、その細胞培養には無血清培養液もしくは自己血漿添加培養液にて十分実施が可能であると判断された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

消化器癌における免疫療法。東京女子医科大学学会誌, 74, 291-299, 2004

Immunohistological Evaluation of Single Small Hepatocellular Carcinoma with Negative Staining of Monoclonal Antibody Hepatocyte Paraffin 1. J Surg Oncol. 88, 104-107, 2004

樹状細胞を用いた癌免疫療法の理論と実際。

血液・免疫・腫瘍, 9(1), 51-63, 2004

腫瘍細胞の多様性に対応した複合癌免疫細胞療法の新規開発。癌と化学療法, 31(11), 1655-1658, 2004

最新のがん免疫療法。総合臨床, 53(8), 2255-2260, 2004

##### 2. 学会発表

樹状細胞ワクチンと活性化リンパ球による消化器癌術後・再発転移予防効果。第 42 回日本癌治療学会総会, 2004

消化器癌に対する樹状細胞と活性化リンパ球を併用した複合癌免疫細胞療法。第 59 回日本消化器外科学会総会, 2004

NK 細胞を用いた癌免疫細胞療法の新展開。第 24 回日本バイオセラピー学会総会, 2004

## 分担研究報告書

### 癌免疫細胞療法における凍結血漿の使用に関する研究

分担研究者 山口佳之 広島大学原爆放射線医科学研究所腫瘍外科講師

#### 研究要旨

高度先進医療「活性化自己リンパ球移入療法」において、自己血漿成分の有用性について検討した。その結果、2%自己血漿および胸・腹水上清添加 RPMI1640 培養液によって癌性胸・腹水リンパ球の培養・活性化が可能であり、治療効果が認められた。

#### A. 研究目的

民間療法「免疫細胞療法」(以下、同療法)が拡がる中、日本赤十字血液センターが提供する凍結血漿が同療法における免疫細胞の培養に使用され、凍結血漿の本来の適応である大量出血に伴う血漿成分の補充などの目的に支障をきたしかねない状況が発生し問題となった。本分担研究においては、凍結血漿に代わって自己血漿成分を用いて免疫細胞の培養・活性化が可能かどうかについて検討した。

#### B. 研究方法

癌性胸・腹水に対する高度先進治療「活性化自己リンパ球移入療法」において、自己リンパ球の培養・活性化に自己血漿および胸・腹水上清の応用が可能かどうか、リンパ球の増殖、抗腫瘍活性、および治療効果の観点から検討した。(倫理面への配慮)当科においては従来より自己血漿および胸・腹水上清を用いてリンパ球を培養・活性化しており、倫理的問題はない。文書によって同意を得た癌性胸・腹水症例に対して高度先進治療「活性化自己リンパ球移入療法」を実施した。

#### C. 研究結果

自己血漿および2%自己胸・腹水上清添加 RPMI-1640 培養液によって、患者自己リンパ球は培養・活性化可能であった。

得られた活性化リンパ球は自己腫瘍細胞障害活性を有し、治療的局所投与によって癌性胸・腹水の局所制御効果が得られた。

#### D. 考察

担癌によって免疫抑制因子が増加し、有効な抗腫瘍リンパ球の誘導を阻害することが報告されている。したがって、癌に対する活性化リンパ球養子免疫療法を実施する場合、活性化リンパ球の培養系に10%自己血清を添加することは有効なリンパ球の誘導に障害をきたす恐れがあり、健常者より採取した同種血清は有用と考えられる。しかしながら、同種血清では感染症を移入する可能性がありそのことの重大性と入手に限界があることを考慮すると、自己血漿の応用が可能であるならそれに勝るものはなかるう。

今回、自己血漿および自己胸・腹水上清の応用について検討したところ、自己血漿では1-2%、自己胸・腹水上清では2%の添加において、活性化リンパ球の誘導が可能であり、誘導されたリンパ球は自己腫瘍細胞障害活性を有し、治療的応用においても有効であることが認められた。このことは、癌性胸・腹水に対する高度先進治療「活性化自己リンパ球移入療法」を実施するうえで、自己血清や自己胸・腹水上清を用いることは免疫抑制因子の観点から負の側面を有する一方、より現実的でありメリットが少なくないことを示唆している。

## E. 結論

癌性胸・腹水に対する高度先進治療「活性化自己リンパ球移入療法」においては、自己血漿および自己胸・腹水上清の応用で実施可能である。

## F. 健康危惧 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. YOSHIHARU KAWABUCHI, YOSHIYUKI YAMAGUCHI, AKIKO OHSHITA, KAZUHITO MINAMI, TETSUYA TOGE: Host-oriented Peptide Evaluation using Whole Blood Assay for Generating Antigen-Specific Cytotoxic T Lymphocytes. *Anticancer Res* 24: 1193-1200, 2004.
2. Yoshiyuki YAMAGUCHI, Akiko OHSHITA, Yoshiharu KAWABUCHI, Jun HIHARA, Eiji MIYAHARA, Kosuke NOMA, Tetsuya TOGE: Locoregional immunotherapy of malignant ascites from gastric cancer using DTH-oriented doses of the streptococcal preparation OK-432-Treatment of Th1 dysfunction in the ascites microenvironment-. *Int'l J Oncol* 24: 959-966, 2004
3. Yoshiyuki YAMAGUCHI, Kazuhito MINAMI, Akiko OHSHITA, Yoshiharu KAWABUCHI, Kosuke NOMA and Tetuya TOGE: Enhancing Effect of PS-K on IL-2-Induced Lymphocyte Activation-Possible Involvement of Antagonistic Action Against TGF-beta-. *Anticancer Res* 24: 639-648, 2004.

### 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

個別化癌免疫療法：山口佳之、大下純子、弘中克治、岡脇 誠、沖田理貴、松浦一生、上野秀晃、川淵義治、大田耕司、清水克彦、南 一仁、檜原 淳、峠 哲哉。日本癌治療学会誌 39 巻 2 号 Page463(2004.09)

癌抗原ペプチドと樹状細胞を用いた活性化自己リンパ球移入療法 PDAK (peptide-pulsed DC activated killer)の臨床応用：大下純子、山口佳之、岡脇 誠、弘中克治、沖田理貴、松浦一生、上野秀晃、川淵義治、清水克彦、大田耕司、南 一仁、檜原 淳、峠 哲哉。日本癌治療学会誌 39 巻 2 号 Page357(2004.09)

EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines (LCLs)を用いた抗原提示細胞の作製：南 一仁、山口佳之、大下純子、松浦一生、大田耕司、檜原 淳、峠 哲哉。日本癌治療学会誌 39 巻 2 号 Page844(2004.09)

肺癌および乳癌患者における CD4+CD25+制御性 T 細胞の解析：沖田理貴、山口佳之、弘中克治、大下純子、松浦一生、上野秀晃、清水克彦、大田耕司、南一仁、檜原淳、峠 哲哉、別所昭宏、佐伯俊昭、高嶋成光。日本癌治療学会誌 39 巻 2 号 Page843(2004.09)

大腸癌胸・腹水局所より樹立した CD4+キラー細胞の解析：山口佳之、大下純子、川淵義治、清水克彦、大田耕司、南 一仁、檜原 淳、宮原栄治、峠 哲哉。Cancer



Science 95, Page438(2004,9)

癌性胸腹水症例における自己腫瘍細胞特異的 CTL の誘導：山口佳之、大下純子、川渕義治、清水克彦、大田耕司、南 一仁、檜原 淳、宮原栄治、峠 哲哉. Cancer Science 95, Page438(2004,9)

肺癌および乳癌患者における CD4+CD25+制御性 T 細胞の解析：沖田理貴，山口佳之，大下純子，松浦一生，弘中克治，上野秀晃，大田耕治，南一仁，檜原淳，峠哲哉，別所昭宏，佐伯俊昭，高嶋成光. Cancer Science 95, Page311(2004,9)

腫瘍抽出 RNA を用いた CTL の誘導：大下純子，山口佳之，岡脇 誠，弘中克治，沖田理貴，松浦一生，川渕義治，大田耕司，清水克彦，檜原 淳，峠 哲哉. Biotherapy 18, Page87(2004.11)

がん患者における CD4+CD25+制御性 T 細胞の解析：沖田理貴，山口佳之，岡脇 誠，弘中克治，大下純子，松浦一生，上野秀晃，川渕義治，清水克彦，南一仁，大田耕司，檜原淳，峠哲哉. Biotherapy 18, Page130(2004.11)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし

分担研究報告書  
癌免疫細胞療法における凍結血漿の使用に関する研究  
(分担) 研究者 片野光男

研究要旨

凍結血漿添加の代わりに1%人アルブミンを使用し、樹状細胞を誘導し、この樹状細胞を用いて、標準治療に抵抗性の進行癌19例に対するPhase I/II studyを実施した。

A. 研究目的

凍結血漿の代わりに人アルブミンにより末梢単核球より樹状細胞誘導および活性化リンパ球誘導が可能か、さらに、これら細胞を用いて癌に対する免疫細胞療法（平成14年7月九州大学医学部倫理委員会承認）が可能かどうかを検証する。

B. 研究方法

1%人アルブミンを含むGMP-grade RPMI (Hy-Media, Nipro, Tokyo)を用いて誘導した樹状細胞の抗原提示能をin vitro（表面分子のFACS解析）およびin vivoにおける免疫反応誘導（皮膚反応およびELISPOT assay）で検証する。

C. 研究結果

In vitroおよびin vivoにおける樹状細胞の抗原提示能は1%アルブミンでも特に問題はなかった。ただし、活性化リンパ球の増殖に対しては自己血清あるいは凍結血漿添加の方が優れていた（以前のデータと比較して）

D. 考察

リンパ球の増殖の面からは、2-10%の凍結血漿の添加が優れていると思われるが、樹状細胞の誘導においては凍結血漿や自己血清は時として負に作用し、1%アルブミンで代替可能と予想される。また、基礎実験のレベルではアルブミンの添加なしでも樹状細胞誘導は可能であることが示唆さ

れたが今後の問題である。

E. 結論

樹状細胞を用いる免疫細胞療法では1%アルブミンが凍結血漿に代用可能である。活性化リンパ球増殖においては、1%アルブミンより凍結血漿が優れている。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsumoto K. Exosomes secreted from monocyte-derived dendritic cells support in vitro naïve CD4<sup>+</sup> T cell survival through NF- $\kappa$ B activation. Cell Immunol (In press)
2. Nakashima H: Effects of docetaxel on antigen presentation-related functions of human monocyte-derived dendritic cells. Cancer Immunol Pharmacol (In press)
3. Kubo M: Paclitaxel probably enhances cytotoxicity of natural killer cells against breast carcinoma cells by increasing perforin production. Cancer Immunol Immunother 54:468-476, 2005
4. Tasaki A: Three-dimensional two-layer collagen matrix gel culture model for evaluating complex biological functions of monocyte-derived dendritic cells. J Immunol Methods 287:79-90, 2004
5. 片野光男: 免疫学を基盤とした腫瘍制御法の開発。

Biotherapy18(2):107-114,2004

6. Onishi H: Monocyte-derived dendritic cells that capture dead tumor cells secrete IL-12 and TNF- $\alpha$  through IL-12/TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B autocrine loop.

Cancer Immunol Immunother 53:1093-1100,2004

7. Tatsugami K: Dendritic-cell therapy after non-myeloablative stem-cell transplantation for renal-cell carcinoma. Lancet Oncol

5:750-752,2004

## 2. 学会発表

日本外科学会雑誌 105 巻・93, 2004、日本外科学会雑誌 105 巻・304, 2004、日本外科学会雑誌 105 巻・588, 2004、日本癌治療学会雑誌 39 巻 2 号・243, 2004、日本癌治療学会雑誌 39 巻 2 号・358, 2004、Anticancer Research 24:3576, 2004、Biotherapy 18:62, 2004、Biotherapy 18: 69, 2004、

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

なし

## 分担研究報告書

### 癌免疫細胞療法における凍結結晶の使用に関する研究

(分担) 研究者 上田祐二 (京都府立医科大学外科学教室消化器外科学部門)

**研究要旨** 教室では 1998 年から 2002 年までの進行固形癌患者に対する末梢血単球由来樹状細胞(DC)と腫瘍抗原ペプチドを用いた癌ワクチン療法の臨床試験において、DC 培養液(RPMI1640)に添加する血清として、1999 年までの初期(厚生省からの通達前)の患者においては非働化 AB 型凍結血漿を、それ以降は非働化患者自己血清あるいは無血清培養液(AIM-V)を使用してきた。これら過去の治療症例において、安全性、誘導 DC の機能解析、抗腫瘍効果の解析を行い、また健常人ボランティアの末梢血単球からの DC 誘導において、非働化 AB 型凍結血漿の添加効果を他の製剤と前向きに比較検討した。

#### A. 研究目的

ヒト末梢血単球からの樹状細胞(DC)誘導における、AB 型凍結血漿の添加効果および安全性を他の血液由来成分と比較検討することを目的とした。

#### B. 研究方法

進行癌患者の末梢血単球からの DC 誘導(培養液は RPMI1640(日研製薬)を使用)における、非働化 AB 型凍結血漿の添加効果を、その安全性および誘導された DC の機能解析により患者由来非働化自己血清および無血清培地(AIM-V(Gibco社))と retrospective に比較検討した(臨床試験参加症例)。また健常人ボランティアの末梢血単球からの DC 誘導において、非働化 AB 型凍結血漿の添加効果を他の製剤と前向きに比較検討した。

(倫理面への配慮)

DC と腫瘍抗原ペプチドを用いた進行固形癌に対するワクチン療法の臨床試験は 1998 年に京都府立医科大学倫理委員会に承認されており、本臨床試験参加者における解析は患者自身の IC を得て行われた。

#### C. 研究結果

培養液(添加血液由来成分)の相違による、誘導 DC の収量、機能(抗原提示能、サイトカイン

産生能)を以下の 3 群において比較検討した。

第 1 群: DC 培養液として RPMI1640+5%非働化 AB 型凍結血漿を使用

第 2 群: DC 培養液として RPMI1640+5%非働化自己血清を使用

第 3 群: DC 培養液として無血清培養液である AIM-V を使用

臨床試験参加の進行固形癌患者、健常人ボランティアにおいて別個に解析した結果、健常人ボランティアにおいては DC の収量、機能ともに 3 群で有意差を認めなかった。しかし、進行固形癌患者においては、第 2 群が DC の収量、機能ともに他の 2 群に比し有意に劣っており、進行癌患者血清中に存在する免疫抑制性サイトカインが DC 誘導に阻害的に関与している可能性が示唆された。

また、非働化 AB 型凍結血漿を使用する際には、高速遠沈により蛋白凝集成分を分離、濾過してから使用しても、細胞培養において検体によっては細胞成分の凝集が認められることがあり、培養液に 5 単位/ml 程度のヘパリン添加が必要であった。

DC と腫瘍抗原ペプチドを用いた進行固形癌に対するワクチン療法の臨床試験に参加された初期の 10 例の非働化 AB 型凍結血漿使用例においては、ウイルス感染等の副作用を示唆する臨床所見は 1 例も認められなかった。

臨床試験参加全 22 例において 1 例も明らかな腫瘍の縮小は認められなかったが、腫瘍マーカーの低下から長期の生存が得られた症例は複数認

められた。これら有効症例は、非働化 AB 型凍結血漿使用症例においても、非働化自己血清使用症例においても、無血清培養液使用症例においても認められた。

#### D. 考察

非働化 AB 型凍結血漿は、免疫抑制性サイトカインを多く含む進行癌患者由来自己血清よりも、*in vitro*での抗腫瘍性 DC 誘導に優れることが示唆された。しかし未知のウイルス感染を中心としたその安全性に関しては未知数である。高価ではあるが臨床使用に供する DC の誘導、培養においては、やはり GMP grade の無血清培養液の使用が妥当と考えられる。

#### E. 結論

治療用 DC 誘導における非働化 AB 型凍結血漿使用は、進行癌患者由来自己血清の使用よりも抗腫瘍性の高い DC 誘導に優れるが、その安全性に関して不安がある。GMP grade の無血清培養液の使用が妥当と考えられる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ueda Y, Itoh T, Nukaya I, Kawashima I, Okugawa K, Yano Y, Yamamoto Y, Naito K, Shimizu H, Imura K, Fuji N, Fujiwara H, Ochiai T, Itoi H, Sonoyama T, Hagiwara A, Takesako K, Yamagishi H. Dendritic cell-based immunotherapy of cancer with carcinoembryonic antigen-derived, HLA-A24-restricted CTL epitope: Clinical outcomes of 18 cases with metastatic gastrointestinal or lung adenocarcinomas. *Int J Oncol* 24: 909-918, 2004.
2. Ueda Y, Sonoda Y, Fujiki H, Harada S, Kimura T, Itoh T, Imura K, Naito K, Nomura K, Taniwaki M, Yamagishi H. Mobilization of peripheral blood stem cells (PBSCs) after original etoposide, adriamycin, and cisplatin therapy and a multimodal cell therapy approach with PBSCs in advanced gastric cancer. *Oncol Rep* 12: 323-332, 2004.

3. Okugawa K, Itoh T, Kawashima I, Takesako K, Mazuda O, Nukaya I, Yano Y, Yamamoto Y, Yamagishi H, Ueda Y. Recognition of Epstein-Barr Virus (EBV)-associated gastric carcinoma cells by cytotoxic T lymphocytes induced in vitro with autologous lymphoblastoid cell line (LCL) and LMP2-derived, HLA-A24-restricted 9-mer peptide. *Oncol Rep* 12: 725-732, 2004.

4. 上田祐二, 山本芳樹, 山岸久一, 島垣昌明, 寺本和雄. 新しい癌の体外循環治療技術の開発. 医学のあゆみ 208, 1012-1013, 2004.

##### 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 完全 closed system での体外循環治療による癌免疫細胞療法の構築 (ワークショップ 7: Cell Therapy -展望と問題点-). 上田祐二, 山本芳樹, 岩本在弘, 島垣昌明, 寺本和雄, 内藤 慶, 清水啓二, 甲原純二, 山岸久一. 第 17 回日本バイオセラピー学会総会 (2004 年・11 月・北九州), *Biotherapy* 18 (Suppl 1), 77, 2004.
2. 胃癌ワクチン療法へ臨床応用可能な外来性 GM-CSF 非依存性の単球由来成熟樹状細胞誘導 (シンポジウム 4: 胃癌に対する免疫療法の新展開). 上田祐二, 糸井啓純, 伊藤 剛, 矢野裕太郎, 山岸久一. 第 76 回日本胃癌学会総会 (2004 年 3 月・米子), 第 76 回日本胃癌学会総会記事, 101, 2004.
3. OK-432 を用いた外来性 GM-CSF 非依存性成熟樹状細胞の誘導. 内藤 慶, 上田祐二, 伊藤 剛, 甲原純二, 井村健一郎, 稲田 聡, 清水啓二, 矢野裕太郎, 山岸久一. 第 17 回日本バイオセラピー学会学術集会総会 (北九州) (2004 年 11 月). *Biotherapy* 18 (Suppl 1), 99, 2004.
4. OK-432 を用いた外来性 GM-CSF 非依存性成熟樹状細胞の誘導. 内藤 慶, 上田祐二, 伊藤 剛, 甲原純二, 井村健一郎, 稲田 聡, 清水啓二, 矢野裕太郎, 山岸久一. 第 17 回日本バイオセラピー学会学術集会総会 (北九州) (2004 年 11 月). *Biotherapy* 18 (Suppl 1), 99, 2004.
5. 融合細胞ワクチン療法における樹状細胞の成

熟度が抗腫瘍効果に与える影響. 清水啓二, 栗山英之, 上田祐二, 山岸久一, Shu Suyu. 第17回日本バイオセラピー学会学術集会総会(北九州)(2004年11月). Biotherapy 18 (Suppl 1), 101, 2004.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

特願 2004-16468

「血液の免疫賦活用カラム」

発明者：上田祐二, 山本芳樹, 山岸久一

出願人：山岸久一

癌免疫細胞療法における凍結血漿の使用に関する研究

分担研究者 谷 眞至

研究要旨 FFP の使用は通常使用する AB 血清と何ら遜色はなく使用できる可能性がある。  
ある。

A. 研究目的

凍結血漿が活性化リンパ球ならびに樹状細胞の誘導に及ぼす影響につき検討した。

B. 研究

自己リンパ球と非働化した自己腫瘍細胞を 100 : 1 の比で 5 日間混合培養した後、固相化抗 CD3 抗体と IL-2 10 IU/ml で 4 週間培養し、得られたリンパ球の個数と細胞表面抗原の解析を行った。

(倫理面への配慮)

同意を得られた場合にのみ、解析に用い、実名は使用せず、個人の特ができないようプライバシーにも考慮した。

C. 研究結果

RPMI-1640 に AB 血清を 5 % と 10 % で添加した場合、どちらも  $5 \times 10^8$  のリンパ球が誘導された。表面抗原もほぼ同じで、ほとんどが CD3 陽性 T 細胞であり、CD80 陽性細胞は約 10 % であった。しかし、無血清では培養が不可能であった。次に、樹状細胞を単離し、プラスチック・ディッシュ付着細胞を IL-4 と GM-CSF 下に培養する際に RPMI-1640 に FFP(AB) を 10 % 添加したが、CD80 陽性細胞は 80%、CD86 陽性細胞は 90% と良好であった。

D. 考察

FFP の使用は通常使用する AB 血清と何ら遜色はなく、拡大使用できる可能性がある。しかし、どのような FFP を使用するのか(例えば、期限切れ

のものなど使用が可能か)など検討すべきである。

E. 結論

癌免疫療法において FFP 使用におけるリンパ球の誘導の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Ueno M, Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Ueda K, Tani M, Yamaue H. Complication of jejunal pouch interposition after proximal gastrectomy: case report. Hepatogastroenterology. 2004; 51(57): 916-8.

2: Ina S, Tani M, Takifuji K, Yamazoe S, Nakatani Y, Yamaue H. Virus-associated hemophagocytic syndrome and hemorrhagic jejunal ulcer caused by cytomegalovirus infection in a non-compromised host; a case report of unusual entity. Hepatogastroenterology. 2004; 51(56): 491-3.

3: Uchiyama K, Onishi H, Tani M, Kinoshita H, Ueno M, Yamaue H. Timing of laparoscopic cholecystectomy for acute cholecystitis with cholecystolithiasis. Hepatogastroenterology. 2004; 51(56): 346-8.

4: Kawai M, Uchiyama K, Tani M, Onishi H, Kinoshita H, Ueno M, Hama T, Yamaue H. Clinicopathological features of malignant

intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas: the differential diagnosis from benign entities. Arch Surg. 2004; 139(2): 188-92.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし



## 分担研究報告書

癌免疫細胞療法における凍結血漿の使用に関する 研究

(分担) 研究者 河野浩二

研究要旨 活性化リンパ球移入療法や癌ワクチン療法などの癌免疫細胞療法では、培養過程において凍結血漿は必要なく培養が可能である。また、担癌では regulatory T 細胞 (T-reg) が誘導され、癌免疫細胞療法の効果増強には T-reg の制御が必要である。

### A. 研究目的

活性化リンパ球移入療法や癌ワクチン療法などの癌免疫細胞療法において、培養過程において凍結血漿が必須であるか否かを検討し、癌免疫細胞療法の効果増強のための方策を探る。

### B. 研究方法

末梢血リンパ球の増殖、活性化過程や、単球由来樹状細胞の分化誘導、成熟過程において、凍結血漿添加、自己血清添加、無添加の3群において比較検討した。

### C. 研究結果

末梢血リンパ球は、凍結血漿や自己血清非存在下で、IL-2と固相化CD3にて十分な増殖が得られ、活性化マーカーも良好であった。単球由来樹状細胞の誘導は、GM-CSF+IL-4条件下で凍結血漿添加が有効であったが、その作用は自己血清添加で代用できた。担癌状態ではT-regが誘導されており、リンパ球の増殖、活性化を抑制した。

### D. 考察

IL-2と固相化CD3条件下では、良好なリンパ球の増殖、活性化が得られ、また、樹状細胞は、自己血清存在下で誘導が可能であった。

### E. 結論

癌免疫細胞療法では、培養過程において凍結血漿は必要なく培養が可能である

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Hiromichi Kawaida, Koji Kono, et.al.  
Distribution of regulatory T cells in  
tumor-draining lymph nodes in patients

with gastric cancer. *Journal of Surgical Research* 124;151-157, 2005

Kousaku Mimura, Koji Kono, et.al.  
Frequencies of HER-2/neu expression  
and gene amplification in patients with  
esophageal squamous cell carcinoma.  
*British Journal of Cancer* in press 2005  
(online available).

#### 2. 学会発表

河野浩二 他、Herceptinの新しい作用機序と  
HER-2を分子標的とした新規消化器免疫療法  
第46回日本消化器病学会、ワークショップ  
H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

#### 1. 特許取得

なし

抗原特異的 T リンパ球並びに NKT 細胞培養において、ヒト血清添加が与える影響の検討に関する研究

（分担）研究者 平家勇司

研究要旨 無血清、牛胎児血漿、ヒト血漿アルブミン、或いは自己血漿存在下で、CMV Lysate 刺激 CD4T 細胞を誘導・培養し、その培養効率を比較検討した。牛胎児血漿、ヒト血漿アルブミン、或いは自己血漿存在下で NKT 細胞を培養し、その培養効率を比較検討した。関東地区で培養リンパ球を用いた免疫療法を行っている医療機関における、ヒト血漿・血清の使用状況をアンケート調査した。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名 平家勇司・国立がんセンター研究所・薬効試験部・主任研究官

3) 関東地区で培養リンパ球の臨床投与を行っている医療機関に対し、ヒト血漿・血清の使用状況に関して Mail を用いてアンケート調査を行った。

#### A. 研究目的

培養細胞を用いた細胞療法は今後盛んになると予想される。治療用細胞の培養では、高い培養効率が必要となるため、ヒト血漿・血清を用いることが多い。一方、ヒト血漿・血清にはウイルスやプリオンのコンタミが考えられ、細胞製剤製造の観点からは血漿・血清を用いない培養系が理想的である。本年度は、我々が行おうとしている CMV Lysate 刺激 CD4T 細胞並びに NKT 細胞の培養に、ヒト血漿・血清が必須であるか否かを検討した。さらに、現時点で培養細胞を臨床投与している医療機関におけるヒト血漿・血清の使用状況を確認することを目的とした。

#### B. 研究方法

1) CMV Lysate 反応性 CD4T 細胞の誘導・増殖：10%牛胎児血清、1%, 5%, 10%ヒト血漿それぞれと、CMV Lysate とヒト IL-2 を含む AIM-V 培地を用いて、健常ボランティア末梢単核球を培養し、CMV 反応性 CD4T 細胞の選択増殖性を検討した。

2) NKT 細胞の誘導・増殖：10%牛胎児血清、1%, 5%, 10%ヒト血清アルブミン、1%, 5%, 10%ヒト血漿・血清それぞれと、 $\alpha$ GalCer 並びにヒト IL-2 を含む AIM-V 培地を用いて、健常ボランティア末梢単核球を培養し、NKT 細胞の選択培養性を検討した。

#### （倫理面への配慮）

研究計画書を作成し、国立がんセンター内の倫理審査委員会の承認を得て行った。採血に際しては、同日のボランティアの健康状態を観察し、不利益を与えないよう配慮を行った。

#### C. 研究結果

1) CMV Lysate 反応性 CD4T 細胞培養において、ヒト血清が牛胎児血清より効率よく CD4T 細胞の増殖を促した。結果として、現時点の培養液においてはヒト血清の使用は必須であると考えられた。ヒト 5%血清・血漿と 10%血清・血漿間では差は見られなかった。

2) NKT 細胞の培養において、ヒト血清含有培地、ヒト血清アルブミン含有培地と比較して高い NKT 細胞誘導効率がえられた。血清・血漿間では差は見られなかった。これらの結果より、NKT の培養においてもヒト血清或いは血漿が培養に必須であることが示唆された。

血清・血漿・蛋白	Valpha24 陽性細胞
FBS(10%)	17.40%
HSA(10%)	1.50%
自己血漿(5%)	53.00%
自己血漿(10%)	68.00%
自己血清(10%)	56%
自己血清(5%)	64.90%

3) 関東地区で培養リンパ球を用いた治療を行っている医療機関へヒト血漿・血清利用状況に関するアンケート調査を Mail を用いて行った。回答は2機関から得られた。導入リンパ球を増殖させる系においては3%の自己血漿を用いており、樹状細胞を培養させる系においては無血清培地を用いた培養を行っていた。回答が得られなかった施設をパンフレット或いはホームページにて確認したところ、自己血漿・血清を用いている例が半数以上見られた。

#### D. 考察

我々の基礎検討の結果、効率良いリンパ球系の培養にはヒト血清・血漿が必須であると考えられた。細胞製剤の観点からは、ウイルス・プリオン等の感染の危険を否定できない動物（ヒトを含む）由来の血漿・血清成分を含まない培地が理想

的であるが、現時点では培養効率の面で血漿・血清添加はやむをえないことであると考えられた。最終的には高い増殖効率の無血清培地を開発することが目標であるが、当面の現実的対応として培養に使用する血清・血漿の安全性向上と、基準作りが大切であると考えられた。

#### E. 結論

CMV-Lysate 反応性 CD4T 細胞の増殖並びに NKT 細胞の増殖実験において、ヒト血清・血漿の必要性が示唆された。実際に培養細胞を用いた治療を行っている多くの機関でも血漿・血清を用いた培養を行っていることが、明らかとなった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

別紙

##### 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

該当事項なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

該当事項なし

## 分担研究報告書

### 癌免疫細胞療法における凍結血漿の使用に関する調査研究

(分担) 研究者 裕 彰一 山口大学医学部講師

研究要旨：細胞療法における FFP の使用が問題となっている。今回、FFP 使用の功罪について検討した結果、FFP を使用しなくても十便に細胞療法は可能であり、また、FFP が貴重な献血に基づいていること並びにウイルス感染の危険性があることなどから、FFP の使用は慎むべきと考えられた。

#### A. 研究目的

本研究では、本邦における細胞免疫療法の現状について調査するとともに、各種細胞培養法による抗腫瘍活性誘導効率を検討することにより、凍結血漿の不必要性を証明する。

#### B. 研究方法

細胞傷害性 T 細胞 (CTL) ならびに樹状細胞 (DC) の誘導・活性化において、培養液への FFP 添加の功罪について検討した。

(倫理面への配慮)

今回本研究に参加する施設では、癌細胞免疫療法をすでに倫理委員会承認の下に臨床応用しており、患者に対するインフォームドコンセントも整備されている。この治療にあわせて本研究を推進できる。また、アンケート調査や実地調査に関しても各施設の情報は一般に公開することはない。

#### C. 研究結果

CTL ならびに DC において、AIM-V なる培養液を使用することにより、FFP の添加を必要としなかった。

#### D. 考察

細胞療法における FFP の使用は、不要であるばかりでなく、貴重な献血に基づいていること、ウイルス感染の危険をはらんでいることなどを勘案すると浪費性かつ危険性を高めることによる「罪」の側面が大きいものと考えられた。

#### E. 結論

細胞療法における FFP の使用は、厳に慎むべきである。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Tumor secreting high levels of IL-15 induces specific immunity to low immunogenic colon adenocarcinoma via CD8+ T cells. Araki A, Hazama S, Yoshimura K, Yoshino S, Iizuka N, Oka M. Int J Mol Med. 2004 Oct;14(4):571-6.

裕 彰一、岡 正朗, 消化器外科学レビュー2004—最新主要文献と解説—, 癌の補助療法 (免疫など), 34-39, 総合医学社, 東京, 2004 年

裕 彰一、岡 正朗, 免疫逃避機構. コンセンサス癌治療, 3(2), 110-110, 2004

##### 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

MHC class II 発現低下と肝細胞癌における術後肝内再発. 飯塚徳男, 的場勝弘, 権藤俊一, 岡部尚文, 為佐卓夫, 恒富亮一, 裕彰一, 浜本義彦, 岡正朗. 日本癌治療学会 39 巻 2 号 Page636 (2004.09)

癌に対する個別化治療(食道・胃) Lentinan と各種免疫担当細胞結合様式の検討. 近藤浩史, 裕彰一, 吉野茂文, 佐野昭子, 丹黒章, 須賀哲也, 須賀泰世, 岡正朗. 日本癌治療学会誌 39 巻 2 号 Page464(2004.09)