

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17年度 総括・分担研究報告書

平成18年（2006）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-----	1
II. 分担研究報告	
1. 免疫細胞の活性化培養における血漿の必要性に関する研究-----	5
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-----	6
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血漿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血漿の使用に関する研究-----	14
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	----- 25

（総括）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

主任研究者 岡 正朗 山口大学医学部第2外科・教授

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、基礎的検討を行うと共に、FFP の使用状況を研究施設で調査した。自己血清または5%合成アルブミン添加により、抗腫瘍活性を有するリンパ球や樹状細胞の誘導が可能であった。細胞療法の誘導には FFP は使用する必要がない。

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 山梨大学医学部第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 山口大学医学部第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

昨年度リストアップした細胞療法を行っている施設に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行った。

C. 研究結果

アンケート調査を全国 36 施設（昨年度リストアップ）に送付したものの、全く返答がなかった。このことは極めて問題であり、特に民間レベルでの細胞療法については、立ち入り検査を含めて詳細な調査を必要とすると考える。また、細胞療法のガイドラインを作製し、効果および副作用報告、FFP 使用量など報告義務を課す必要がある。

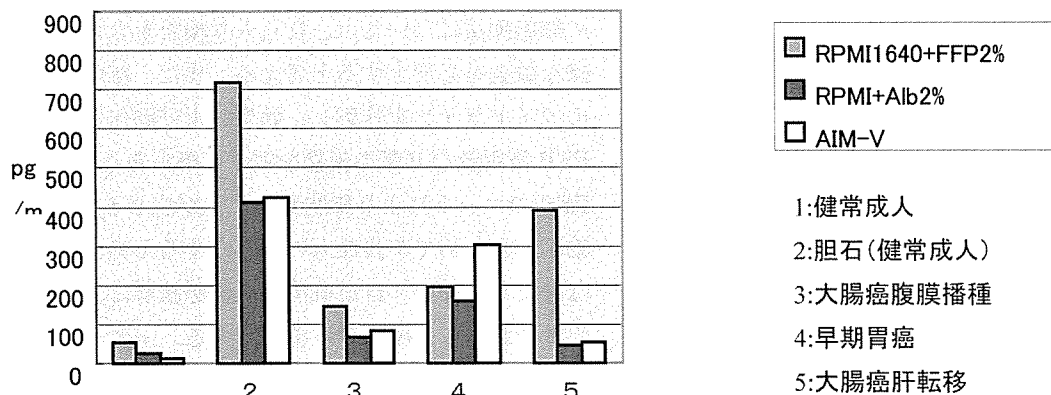
FFP のロットにより細胞誘導に差が生じる。誘導効率のきわめて不良なものが存在するため、使用は好ましくない。自己血清での細胞誘導は、担癌患者において、細胞誘導を抑制する。十数パーセントの患者において細胞誘導が十分ではなかったとの報告があった。参加 6 施設の細胞誘導条件を表 1 に示した。AB 血清を使用している施設が一施設であったが、FFP を使用している施設は全くなかった。公的機関での現状を見ても FFP を細胞誘導に使用する必要はないと言える。

表1. 参加6施設での細胞誘導における添加血清等の調査結果

	誘導細胞の種類	使用培養液	添加血清など(濃度)
東京女子医科大学	CD3 活性化リンパ球(CAT)	AIM-V	自己血清(2%)
	樹状細胞ワクチン	AIM-V	なし
	DC 活性化リンパ球(DCAT)	AIM-V	自己血清(2%)
	胸腹水浸潤リンパ球(TIL)	AIM-V	なし
	腫瘍内樹状細胞局注	AIM-V	なし
	γδ型T細胞	AIM-V	自己血清(2%)
	NK細胞	AIM-V	自己血清(2%)
山梨大学	活性化リンパ球	X-VIVO	なし
	樹状細胞	RPMI1640	自己血清(2%)
和歌山医科大学	CTL	RPMI-1640	AB 血清(5%)
	樹状細胞	RPMI1640	AB 血清(10%)
広島大学	peptide-DC 活性化リンパ球	RPMI1640	自己血清(2%)
国立がんセンター	樹状細胞	X vivo	なし
山口大学	樹状細胞	RPMI1640	自己血清(2%)
	DC 活性化リンパ球	AIM-V	なし

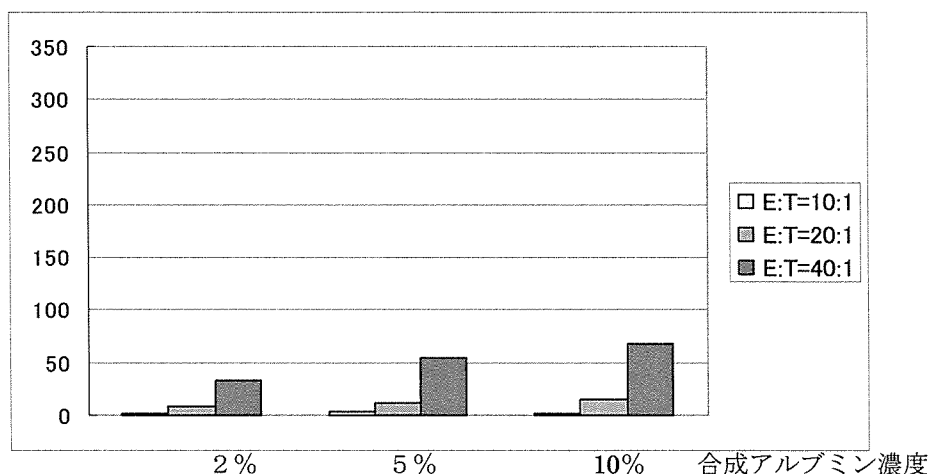
全ての施設で、FFP の仕様はなかった。

図1. FFP と合成アルブミン (Alb2) の活性化リンパ球誘導に及ぼす影響



上記の実験は、健常者、良性疾患患者、がん患者において、末梢血リンパ球を採取し、IL-2 添加による活性化リンパ球の誘導を比較したものである。FFP がやや良い症例もあるが、合成アルブミンでも誘導可能であり、今後はこの使用が推奨される。また、合成アルブミンの添加濃度を検討した結果を異化に示す。

図2. 合成アルブミン濃度と活性化リンパ球誘導能の比較



以上のように、合成アルブミンの添加は5%で十分と考えられた。この結果は、活性化リンパ球誘導に必要な合成アルブミン濃度を決定したものであり、大きな成果といえる。

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 の必要性を裏付けるデータを収集した。その結果、自己血清および合成アルブミンで活性化リンパ球が誘導されることが確認された。GMP 基準を満たす細胞誘導には合成アルブミンが適当であり、今後の開発が待たれる。

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%）、実際に行っている施設のデータのみが収集されるにとどまった。今後は強制的な報告義務を課す必要があると思われた。

E. 結論(ならびに今後の研究方針)

1) 活性化リンパ急の誘導には FFP は不要で、自己血清でも良いが、GMP 基準を満たすには合成アルブミンが適当であり、薬剤としての承認が待たれる。

2) 細胞療法の施設には、誘導等の報告書を義務づけるべきである。

F. 研究発表

1. 論文発表

・ 著書

碓 彰一、岡 正朗：「癌の補助療法（免疫など）」
消化器外科レビュー2005 p197-201 株式会社総合医学社 2005. 4.

長島由紀子、山本光太郎、矢原昇、河岡徹、
岡 正朗：「膵癌における治療方法とその成績」
これだけは知っておきたい癌の免疫化学療法
p97-103 株式会社総合医薬ジャーナル社
2005. 5

・ 論文

Yamamoto K, Ueno T, Kawaoka T, Hazama S,
Fukui M, Suehiro Y, Hamanaka Y, Ikematsu Y,
Imai K, Oka M, Hinoda Y. MUC1 peptide
vaccination in patients with advanced pancreas
or biliary tract cancer. *Anticancer Res.*
2005 ;25(5):3575-9.

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. 2005 May;13(5):874-83.

須賀泰世、高井健治、近藤浩史、佐野昭子、梶田紀明、裕彰一、吉野茂文、須賀哲也、岡 正朗、村田正弘
ヒト単球のレンチナン結合能測定法ならびに簡便法の確立. Biotherapy 20(1) : 79-83、 2006

岡 正朗

手術侵襲と免疫

侵襲と免疫 15(1) 20-23, 2006 3

吉野茂文、裕彰一、清水良一、福田進太郎、工藤明敏、水田英司、小倉寛、佐野昭子、岡正朗
PSK による大腸癌術後補助免疫化学療法の Responder 判定におけるエビデンス 癌と化学療法 32 : 1568-1570 2005.

河岡徹、吉野茂文、近藤浩史、山本光太郎、裕彰一、岡正朗
癌性胸腹水に対する Lentinan+OK-432 胸腹腔内反復投与の臨床的検討 癌と化学療法 32 1565-1567、2005.

裕彰一、岡正朗 侵襲後の免疫不全 病態と治療 外科治療 巻5号 1028-1034、2005.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

河岡 徹、山本光太郎、吉野茂文、裕 彰一、丹黒 章、岡 正朗 「膵癌に対する MUC1-CTL を用いた術後補助免疫療法」; p 483

第 105 回日本外科学会定期学術集会 2005(H17 年)

近藤浩史、裕 彰一、吉野茂文、佐野昭子、須賀哲也、須賀泰世、岡 正朗 「レンチナン(LNT)-

単球結合率の個人差からみた LNT 有効症例選別の可能性」; p 91

第 26 回癌免疫外科研究会 東京 2005(H17 年)

吉野茂文、裕彰一、山本達人、鈴木道成、平澤克敏、小倉寛、足立淳、森岡秀之、矢原昇、長谷川博康、多田耕輔、福田進太郎、上山吉哉、岡正朗
多施設共同研究による微粒子化 Lentinan の進行癌患者に対する QOL 改善効果の検討」; p 91
第 43 回日本癌治療学会総会 名古屋 2005(H17 年)

得能和久、吉野茂文、裕彰一、山本光太郎、河岡徹、近藤浩史、岡正朗 「消化器癌化学療法に免疫療法を併用する意義—QOL および Th1/2 バランスの観点から—」; P58 第 18 回日本パオセラピー学会学術集会総会 山口 2005(H17 年)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし

厚生労働科学研究費補助金（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）
分担研究報告書

免疫細胞の活性化培養における血漿の必要性に関する研究
(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

癌に対する免疫細胞療法に利用する免疫細胞の活性化培養における血漿添加の有用性に関する基礎的検討を実施した。

A. 研究目的

癌に対する免疫細胞療法に利用する免疫細胞の活性化培養における自己血漿及びアルブミン添加の有用性を検討した。

B. 研究方法

健常人 3 名及び癌患者 3 名の末梢血単核細胞を採取し、抗 CD3 抗体と IL-2 にて活性化培養を行う際の自己血漿及びアルブミン添加の有無による細胞増殖率を比較検討した。

(倫理面への配慮)

健常人ボランティア及び本研究に同意の得られた患者から採血した末梢血単核細胞を利用した基礎的検討であり、倫理的に問題ない。

C. 研究結果

健常人及び癌患者のいずれも免疫細胞（主に T リンパ球）の活性化増殖は無血清培養で十分可能であったが、2%の自己血漿添加により約 2 倍の細胞増殖が認められ、さらに 0.1%のアルブミン添加により最大 23.5%の細胞増殖が認められた。

D. 考察

癌に対する免疫細胞療法が普及しつつあるが、免疫細胞の活性化培養における血漿の利用は安全性の面を考慮して、無添加もしくは自己血漿の利用が適切と考えられる。アルブミン製剤の添加も有用であったが、アルブミン製剤自体の適切利用を考慮する必要がある、今後のリコンビナント製剤の開発を待つことが賢明と判断される。

E. 結論

免疫細胞の活性化培養には無血清培養もしく

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

選択的培養法による NK 細胞療法の新展開。

Biotherapy, 19(4), 317-324, 2005

悪性腫瘍に対する抗体併用細胞療法の基礎的検討。*Biotherapy*, 19(5), 430-434, 2005

術後肝癌再発抑制を目指した樹状細胞療法。

BIO Clinica, 21(2), 25-29, 2006

皮内反応は腫瘍抗原に対する特異的免疫反応と臨床効果の指標になるか。*Biotherapy*, 20(2), 190-196, 2006

バイオセラピーにおける QOL 評価のための調査票—FACT-BRM 日本語版の開発—。*Biotherapy*, 20(2), 217-222, 2006

2. 学会発表

化学療法後の樹状細胞療法の基礎研究。第 26 回癌免疫外科研究会、2005

肺癌に対する抗 EGFR 抗体併用細胞療法の基礎的検討。第 26 回癌免疫外科研究会、2005

臨床医療における細胞療法実施のための設備構築と GMP 導入の現状と問題点。第 18 回日本バイオセラピー学会総会、2005

$\gamma\delta$ 型 T 細胞を用いた肺癌に対する免疫細胞療法の基礎的検討。第 18 回日本バイオセラピー学会総会、2005

活性化 T リンパ球移入によるがん患者における QOL の変動の解析。第 18 回日本バイオセラピー学会総会、2005

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

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

胃癌腹水6症例において、末梢血付着細胞分画より GM-CSF, IL-4 存在下に DC を誘導後、腹水腫瘍細胞より抽出・増幅した mRNA を導入し抗原提示細胞とし、末梢血非付着細胞分画（リンパ球）を刺激して、抗腫瘍性リンパ球 TRiDAK (tumor RNA-introduced DC-activated killer) 細胞を誘導する実験系において、自己血清の有用性について検討した。

（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。

C. 研究結果 TRiDAK 細胞を誘導する実験系においても 2%自己血漿添加 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。誘導された TRiDAK 細胞は、自己腫瘍細胞を特異的に障害した。

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移入療法を実施する場合、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、また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ろう。われわれはすでに高度先進治療「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の有用性について報告している。

今回、TRiDAK 細胞の誘導において自己血漿の応用について検討したところ、2%自己血漿の添加において TRiDAK 細胞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示唆された。このことは、癌に対する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 癌に対する活性化自己リンパ球移入療法においては、自己血漿の応用で実施可能である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表論文発表

1. Yamaguchi Y, Jun HIHARA, Katsuji HIRONAKA, Akiko OHSHITA, Riki OKITA, Makoto OKAWAKI, Kazuo MATSUURA, Ichiro NAGAMINE, Takuhiro IKEDA, Masahiro OHARA, Yoichi HAMAI: Postoperative Immunosuppression Cascade and Immunotherapy using Lymphokine-activated Killer Cells for Patients with Esophageal Cancer-Possible Application for Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome-. Oncology Rep 15: 895-901, 2006.
2. Yamaguchi Y, Koji OHTA, Yoshiharu KAWABUCHI, Akiko OHSHITA, Riki OKITA, Makoto OKAWAKI, Katsuji HIRONAKA, Kazuo MATSUURA, Tetsuya TOGE: Feasibility study of adoptive immunotherapy for metastatic lung tumors using peptide-pulsed dendritic cell-activated killer (PDAK) cells. Anticancer Res. 25: 2407-2415, 2005 .
3. Minami K, Yamaguchi Y, AKIKO OHSHITA, YOSHIHARU KAWABUCHI, KOJI OHTA, JUN HIHARA and TETSUYA TOGE: Generation of Antigen Presenting Cells using Cultured Dendritic Cells and Amplified Autologous Tumor-mRNA. Oncology 69: 399-407, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

研究要旨

1%人アルブミンを使用して誘導した樹状細胞を用いて実施した進行固形癌症例に対する癌免疫細胞療法の結果を免疫反応誘導能の面から解析した。

A. 研究目的

前年度の結果を受けて、1%アルブミンにより誘導した樹状細胞および活性化リンパ球を用いて実施した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）の結果を免疫能誘導の面から検証する。

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を用いて実施した免疫細胞療法症例（Phase I:19 症例、Phase I/II:15 症例）における免疫反応誘導（皮膚反応および ELISPOT assay）を検証する。

C. 研究結果

Phase I study の結果：19 例中 8 例に low-grade fever、1 例に一過性の好酸球増多を認めたが治療を要する有害事象は認めなかった。Phase I/II study の結果：15 例中腫瘍マーカー減少を 11 例に、皮膚反応陽転化を 9 例に、ELISPOT 反応増強を 9 例に認め、Phase I study の無反応例（13 例）を対照群とした時、生存期間は有意に延長した ($P<0.0001$) (Anticancer Res 25:3771, 2005)。

D. 考察

1%ヒトアルブミンで誘導した樹状細胞を用いて行った免疫細胞療法においても、高率に皮膚反応および ELISPOT 反応の誘導が可能であり、誘導率は、自己血清等を用いて誘導した樹状細胞ワク

チンの報告例と比較して遜色ない結果であった。

E. 結論

昨年度の基礎的検討の結果同様、樹状細胞を用いる免疫細胞療法では、樹状細胞誘導に際して 1%アルブミンが凍結血漿に代用可能であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsumoto K. Exosomes secreted from monocyte-derived dendritic cells support in vitro naive CD4⁺ T cell survival through NF- κ B activation. Cell Immunol 231:20-29,2004

2. Nakashima H. Effects of docetaxel on antigen presentation-related functions of human monocyte-derived dendritic cells. Cancer Immunol Pharmacol 55:479-487,2005.

3. Katano M. Combination therapy of tumor cell-pulsed dendritic cells and activated lymphocytes for patients with disseminated carcinomas. Anticancer Research 25:3771-3776,2005.

4. Koga K. Purification, characterization and biologic significance of tumor-derived exosomes. Anticancer Research 25: 3703-3708,2005

5. Onishi H. Evaluation of a dysfunctional and short-lived subset of monocyte-derived dendritic cells from cancer patients. Anticancer Research 25:3445-3451,2005.

6. 片野光男. 樹状細胞 (DC) ワクチン療法の現況

と将来. Biotherapy 19:330-338,2005.

7.久保 真.乳癌に対する Herceptin+細胞免疫化学療法の可能性. Biotherapy 19:424-429,2005.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

日本外科学会雑誌 106 巻・195, 2005、日本外科学会雑誌 106 巻・357, 2005、日本外科学会雑誌 106 巻・188, 2005、日本リンパ網内系学会会誌 45 巻・68, 2005.日本リンパ網内系学会会誌 45 巻・

70, 2005. Biotherapy 19:117, 2005、Biotherapy 19: 33, 2005.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

研究要旨 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無血清培養液と比較検討する。

B. 研究方法

転移、再発巣を有する進行固形癌患者の末梢血単球からのDC誘導（培養液：RPMI1640（日研製薬））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養液（AIM-V（Gibco社））と比較検討した（臨床試験参加症例）。末梢血単球は過去の凍結保存検体を解凍して用いた。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比較検討した。

非働化AB型凍結血漿はロットの異なる5検体を混ぜて使用した。

（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DCの機能解析に関するICは臨床試験参加時に得られている。

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因子がDC誘導に阻害的に関与している可能性が示唆された。具体的にはDCの機能解析として、allo-MLR（リンパ球混合培養）によるT cell刺激能およびLPS刺激によるIL-10、IL-12の産生量を検討した。T cell刺激能は第1群、第3群、第2群の順に優れ、第1群、第3群と第2群の間には有意差を認めた（ $P<0.05$ ）。また、IL-10の産生量は3群間に差を認めなかったが、IL-12の産生量は第2群が第1群、第3群に比し有意に劣って

いた (P<0.05)。

また昨年度の報告においても指摘したが、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、進行癌患者末梢血単球からの DC の *in vitro* 誘導において、免疫抑制因子を多く含むと考えられる進行癌患者由来自己血清よりも優れることが示唆された。この差は DC の収量, T cell 刺激能, IL-12 産生量において有意であった。しかし未知のウイルス感染を中心としたその安全性は未知数である。無血清培養液 (AIM-V) は非働化 AB 型凍結血漿添加 RPMI1640 に比し若干劣るが、有意差は認めなかった。

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、その安全性に担保は無い。高価ではあるが GMP grade の無血清培養液の使用が妥当と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimizu K, Ueda Y, Yamagishi H. Titration of serum p53 antibody in patients with gastric cancer : a single institute study of 40 patients. *Gastric Cancer* 8(4), 214-219, 2005.
2. 上田祐二, 山岸久一. 「癌の免疫化学療法」 医薬ジャーナル社 (大阪), 佐治重豊: 編, 2005 年 5 月発行, A4 版 全 227 項, 執筆部分: V. 新しい免疫療法 1. 癌ワクチン療法, p.169~176.
3. 上田祐二, 山岸久一. 「癌の細胞療法」 ~変遷と今後の展開~. *Biotherapy* 19, 115-124, 2005.
4. 岩本在弘, 上田祐二, 寺本和雄, 島垣昌明, 山本芳樹, 伊藤 剛, 清水 健, 塩崎 敦, 玉井秀政, 山岸久一. 担癌ラットにおける免疫抑制物質吸着繊維カラムの細胞性免疫能増強効果. *癌と化学療法* 32 (11), 1583-1585, 2005.
5. Naito K, Ueda Y, Itoh T, Fuji N, Yano Y, Yamamoto Y, Imura K, Shimizu K, Kohara J, Iwamoto A, Shiozaki A, Tamai H, Shimizu T, Mazda O, Yamagishi H,. Mature dendritic cells generated from patient-derived peripheral blood monocytes in one-step culture using streptococcal preparation OK-432 exert an enhanced antigen-presenting capacity. *Int J Oncol*, in press, 2006.
6. Yano Y, Ueda Y, Itoh T, Fuji N, Okugawa K, Naito K, Imura K, Kohara J, Hayashi T, Nakane K, Matsuura Y, Kawai K, Yamagishi H. A new strategy using autologous dendritic cells (DCs) and lymphokine-activated killer (LAK) cells for tumor immunotherapy: Efficient maturation of DCs by the co-culture with LAK cells *in vitro*. *Oncol Rep*, in press, 2006.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. Ueda Y, Naito K, Imura K, Okamoto K, Ichikawa D, Fujiwara H, Kikuchi S, Itoi H, Yamagishi H. Multimodal cell therapy approach with peripheral blood stem cells in advanced gastric cancer - a case report - . 6th International Gastric Cancer Congress, May 4 - 6, 2005, Yokohama, Japan (abstract No.

P32-5)

2. Imura K, Hayashi T, Yano Y, Naito K, Kohara J, Ueda Y, Nakane K, Matsuura Y, Takeda T, Kawai K, Yamagishi H. Immunological reactivity of CTLs induced by electrofusion cells of human dendritic cells and gastric cancer cells. 96th Annual Meeting, American Association for Cancer Research, Aneheim, USA, April16-20, 2005, (abstract No. 4230)

3. 上田祐二, 岩本在弘, 山本芳樹, 伊藤 剛, 島垣昌明, 寺本和雄, 山岸久一. 癌治療用医療機材としての体外循環下免疫療法繊維カラムの開発 (シンポジウム14「癌免疫療法:医薬品化へのステップ」). 第43回日本癌治療学会総会 (2005年10月25日-27日・名古屋), 日本癌治療学会誌 40 (2), 228, 2005.

4. 上田祐二, 岩本在弘, 島垣昌明, 寺本和雄, 山岸久一. トランスレーショナルリサーチとしての癌免疫細胞療法の問題点と体外循環下免疫療法の構築. 第60回日本消化器外科学会総会 (2005年7月20~22日・東京), 日本消化器外科学会雑誌 38 (7), 1068, 2005.

5. 岩本在弘, 上田祐二, 山本芳樹, 島垣昌明, 寺本和雄, 内藤 慶, 甲原純二, 山岸久一. 担癌ラットにおける免疫抑制物質吸着繊維カラムの細胞性免疫増強効果. 第60回日本消化器外科学会総会 (2005年7月20~22日・東京), 日本消化器外科学会雑誌 38 (7), 1250, 2005.

G. 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

厚生労働科学研究費補助金（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）

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 谷 眞至 和歌山県立医科大学 第二外科・講師

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。

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. 研究方法

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。

また、末梢血から樹状細胞を単離し、IL-4 と GM-CSF と 7 日間混合培養し、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、個人の特定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 血清ではなく FFP を 5 % で添加した場合、 5×10^8 のリンパ球が誘導された。表面抗原も、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。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 血清と遜色はなく、

拡大使用できる可能性がある。しかし、倫理性・安全性の面から FFP の使用は控えることが望ましいと思われた。

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. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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での Effector 細胞のひとつである NK 細胞の培養過程において、2%自己血清添加にて良好な NK 細胞が誘導でき、凍結血漿の必要性はないことが確認された。

活性化リンパ球移入療法での Effector 細胞のひとつである NK 細胞の培養過程において、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

健常人および食道癌患者の末梢血単核球を、X-VIVO (GIBCO)、IL-2 (100JRU/ml) 存在下で 14 日間培養後、K562 に対する 51Cr 放出試験にて NK 活性を検討した。その際、FFP 由来血漿添加 (2%)、自己血清添加 (2%)、無添加の 3 群において比較検討した。

C. 研究結果

健常人由来末梢血単核球では、FFP 由来血漿添加群と無添加群に比較し、2%自己血清存在下でもっとも有効な NK 活性が得られた。また、FFP 由来血漿添加群と無添加の間には有意差はなく、血漿添加の有用性は認められなかった。

一方、食道癌患者由来末梢血単核球の培養では、同様の条件下で、3 群間の NK 活性に有意差はなく、いずれも健常人の NK 活性に比べ、低下していた。少なくとも、血漿添加の有用性は認められなかった。

D. 考察

健常人および食道癌患者の末梢血単核球からの NK 細胞誘導過程において、少なくとも、血漿添加の有用性は認められなかった。健常人では、自己血清添加による NK 活性増強効果が認められ、培養過程において自己血清の有効性が示唆され

た。しかしながら、がん患者ではその増強効果は認められず、免疫抑制因子などの関与が想定され、さらなる培養条件の改善が必要である。

E. 結論

末梢血単核球由来 NK 細胞の誘導過程において、必ずしも凍結血漿は必須ではなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kousaku Mimura, Koji Kono, Scott Southwood, John Fikes, Akihiro Takahashi, Naoto Miyagawa, Hidemitsu Sugai and Hideki Fujii. Substitution analog peptide derived from HER-2 can efficiently induce HER-2-specific, HLA-A24 restricted CTLs. *Cancer Immunology and Immunotherapy* in press 2006.

Naoto Miyagawa, Koji Kono, Kousaku Mimura, Hideo Omata, Hidemitsu Sugai, and Hideki Fujii. A newly identified MAGE-3 derived, HLA-A24 restricted peptide is naturally processed and presented as a CTL epitope on MAGE-3-expressing gastrointestinal cancer cells. *Oncology* 2006;70:54-62

Koji Kono, Hiromichi Kawaida, Akihiro Takahashi, Hidemitsu Sugai, Kosaku Mimura, Naoto Miyagawa, Hideo Omata, and Hideki Fujii.

CD4(+)CD25^{high} regulatory T-cells in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer*

Immunology and Immunotherapy in press 2006

Mitsuhiko Hanawa, Shioto Suzuki, Yoh Dobashi, Koji Kono, Akishi Ooi

Protein overexpression and gene amplification of *EGFR* in squamous cell carcinomas of the esophagus. International Journal of Cancer 2005 13:118(5):1173-1180

Kousaku Mimura, Koji Kono, Mitsuhiko Hanawa, Fumihiko Mitsui, Hidemitsu Sugai, Naoto Miyagawa, Akishi Ooi Hideki Fujii . Frequencies of HER-2/neu expression and gene amplification in patients with esophageal squamous cell carcinoma. British Journal of Cancer 92(7):1253-60 2005

Kousaku Mimura, Koji Kono, Mitsuhiko Hanawa, Mirei Kanzaki, Atsuhito Nakao, Akishi Ooi, Hideki Fujii Trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity against esophageal squamous cell carcinoma. Clinical Cancer Research. 2005 11: 4898-4904

2. 学会発表

河野浩二 他、HER-2 を分子標的とした食道癌治療 第 47 回日本消化器病学会、ワークショップ
他 54 演題

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

研究要旨 各種培養液に自己血漿を加え、NKT 細胞並びに CMV Lysate 反応性 CD4T 細胞を誘導・培養し、その効率を比較検討した。培養液の種類によって、培養細胞分化並びに数に大きな違いが見られることが明らかとなった。

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。治療用細胞の培養には、高い増殖効率を得ることが必要となる。高い増殖効率は、投与までの時間の短縮とともに培地の量の節約にも結びつき、それに含まれるヒト血漿使用量を最小にすることが可能となる。本研究では、その第一段階として、NKT 細胞並びに CMV Lysate 反応性 CD4T 細胞培養において、培地の違いが培養効率にどの程度影響するかを検討した。

B. 研究方法

- 1) 5%自己血漿を含む各種市販培地を準備した。市販されていない、特殊培地もあわせて準備した。これらの培地を用いて、健常者末梢血単核球に alpha-GalCer 並びに IL-2 を加えて NKT 細胞を培養した。培養効率は、12 日目の総細胞数、NK 並びに NKT 細胞の割合・総数、K562 を標的細胞とした殺細胞効果、を指標にして評価した。
- 2) CMV Lysate 反応性 CD4T リンパ球培養は、CMV Lysate 単独で 9 日間培養した後、IL-2 単独或いは固層化 CD3、CD3CD28 抗体ビーズを用いて増殖させた。培養開始後 9 日目に、CD4T リンパ球の選択性をフローサイトメトリーにて解析した。

（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) NKT 細胞増殖

総細胞数並びに NK、NKT 細胞数の増殖効率は、培地によって大きく影響を受けることが明らかとなった。欧米で臨床での利用が認められている培地と比較し、増殖効率が高い培地が存在した。

2) CMV Lysate 反応性 CD4T リンパ球

総細胞数並びに CMV Lysate 反応性 CD4T 細胞の選択性において、市販の培地を上回る培地が存在した。

D. 考察

我々の基礎検討の結果、NKT 細胞増殖並びに CMV Lysate 反応性 CD4T 細胞誘導効率は、培地によって大きく左右されることが明らかとなった。また、我々が入手可能な培地が必ずしも最適な培地ではなく、改良の余地が残されていることが明らかとなった。今後、臨床応用を目指して培地の組成を改良していくと共に、最適化された培地の GMP 化を進めていく予定である。

E. 結論

NKT 細胞並びに CMV-Lysate 反応性 CD4T 細胞の増殖実験において、培地組成の最適化の重要性が示唆された。今後、両細胞の選択・増殖のために最適な培地の組成を確立すると共に、その GMP 化を進めていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Harada Y, Imataki O, Heike Y, Kawai H, Shimsaka A, Mori S, Kami M, Tanosaki R, Ikarashi Y, Iizuka A, Yoshida M, Wakasugi H, Saito S, Takaue Y, Takei M, and Kakizoe T: Expansion of α -Galactosylceramide-Stimulated $V\alpha 24+$ NKT Cells Cultured in the Absence of Animal Materials. Journal of Immunotherapy, 28: 314-321, 2005.
- 2) Imataki O, Heike Y, Ishida T, Takaue Y, Ikarashi Y, Yoshida M, Wakasugi H, Kakizoe T: Efficient ex vivo expansion of $V\alpha 24+$ NKT cells derived from G-CSF-mobilized blood cells. J Immunotherapy, in press.

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

研究要旨：タンパク不含培地、血清不含培地、アルブミン含有培地、凍結血漿含有培地を用い、活性化リンパ球を誘導したところ、アルブミン含有培地において十分な抗腫瘍活性を持ったリンパ球が誘導され、凍結血漿が不要であることが示された。

貴重な献血に基づいていること、ウイルス感染の

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

活性化リンパ球の誘導・活性化において、培地として無タンパク培地（凍結血漿、合成アルブミン、タンパク無添加の三種）ならびにタンパク含有培地（AIM-V）を使用し、誘導されたリンパ球の抗腫瘍活性を IFN- γ 誘導能で検討した。

（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

活性化リンパ球は、5%アルブミン添加培地においても十分に誘導され、FFP の添加を必要としなかった。この結果、GMP grade の条件下で FFP なしに活性化リンパ球が誘導されることが確認された。

D. 考察

細胞療法における FFP の使用は、不要であり、

危険をはらんでいることなどから「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。

F. 研究発表

1. 論文発表

・著書

裕 彰一、岡 正朗：「癌の補助療法（免疫など）」
消化器外科レビュー2005 p197-201 株式会社総合医学社 2005. 4.

・雑誌

Yamamoto K, Ueno T, Kawaoka T, Hazama S, Fukui M, Suehiro Y, Hamanaka Y, Ikematsu Y, Imai K, Oka M, Hinoda Y. MUC1 peptide vaccination in patients with advanced pancreas or biliary tract cancer. *Anticancer Res.* 2005 ;25(5):3575-9.

須賀泰世, 高井健治, 近藤浩史, 佐野昭子, 梶田紀明, 裕彰一, 吉野茂文, 須賀哲也, 岡正朗, 村田正弘 ヒト単球のレンチナン結合能測定法ならびに簡便法の確立 *Biotherapy* 20 巻 1 号 79-83 2006.

吉野茂文, 裕彰一, 清水良一, 福田進太郎, 工藤