明　細　書

発明の名称 ：

単球増殖剤、単球増殖用培地、単球の製造方法、樹状細胞の製造方法、及び樹状細胞ワクチンの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、単球増殖剤、単球増殖用培地、単球の製造方法、樹状細胞の製造方法、及び樹状細胞ワクチンの製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、癌の治療において、樹状細胞ワクチンの使用が着目されている。樹状細胞ワクチンは、ワクチンを投与される対象（例えば、癌患者）由来の樹状細胞に癌抗原を取り込ませた（パルスした）樹状細胞から調製され、ワクチンを投与される対象の体内に投与される。投与された樹状細胞はＴ細胞に癌抗原を提示し、抗原を提示されたＴ細胞（ＣＴＬ）は、癌細胞を特異的に攻撃するため、体内の正常細胞を損傷させずに癌を治療することができる。

[0003] ところで、樹状細胞ワクチンの製造のために必要な樹状細胞は、体内から直接分離することができない。そのため、樹状細胞は、ワクチンを投与される対象から採取した血液から単球を分離し、この単球を樹状細胞に分化させることで得る。

[0004] 従来知られる樹状細胞ワクチンを製造するために使用される単球を採取する方法としては、成分採血装置を使用して血液中の白血球を分離する方法（以下、この方法を「アフェレーシス」という）が知られている。しかし、アフェレーシスは、装置の運用に費用がかかる上に、装置の操作のために高度な技術が要求される。また、アフェレーシスでは、単球だけではなく、単球以外の成分（白血球や赤血球や血小板等）も含んだ混合物を採取する。そのため、アフェレーシスの後に赤血球や血小板等の単球以外の成分を除くために単核球の分離工程を行うことが一般的である。

[0005] 樹状細胞ワクチンを臨床応用するには、１回の投与におおよそ１×１０^{7}個

の細胞数を使用することが望ましい。このような細胞数を確保するために、通常、同一の対象から間隔をあけて８回程度のアフェレーシスが行われる。また、血液中に存在する単球の割合は少ないため、樹状細胞ワクチンを製造できるほどに十分な量の単球を得るためにアフェレーシスを用いると、血液をアフェレーシス装置内で循環させて白血球成分を十分に採取する必要があるが、これは体力的また時間的に患者への負担が非常に大きい。そのため、アフェレーシス中、患者の容態が急変すると、アフェレーシスを途中で中断し、樹状細胞ワクチン療法そのものを断念せざるを得ない場合がある。また、アフェレーシスで単球の成分を採取した場合には、通常５～８回分程度の樹上細胞ワクチンを作製することができるとされるものの、得られる樹上細胞ワクチンの実際の量は患者の血液状態等によって変動する。

[0006] また、末梢血を腕等から採取する等の従来の採血方法では、患者の負担は軽いものの、得られた単球をそのまま従来法で樹状細胞に分化させても十分な量の細胞数が得られないという欠点がある。そのため、末梢血の採血から得られた単球から十分な細胞数の樹状細胞ワクチンを作製するには、その過程において単球を増殖させることが課題であり、それを克服する技術が望まれていた。また、このような技術においては、樹状細胞ワクチンの作製期間は、樹上細胞ワクチンの投与間隔を考慮した場合、２週間程度で作製できることがより望ましい。

[0007] そこで、上記の課題を解決するために、血液から分離された単球を体外で増殖させることが考えられる。このような方法として、特許文献１には、単球中の特定の物質の発現を阻害した状態で単球を培養することが開示されている。しかし、この方法は、組換え体の作製工程や、長期の培養時間を要する。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特表２０１０－５１５４４２号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、単球を高効率かつ簡便に増殖させることができる手段を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、造血幹細胞の増殖等に関与する特定のサイトカインが、単球を高効率に増殖できることを見出し、本発明を完成するに至った。本発明は、具体的には、以下のようなものを提供する。

[0011] （１） ＦＩｔ－３Ｌ、ＩＬ－３又はＩＦＮ－γのうちの１つ以上からなり、単球から樹状細胞への分化処理前に使用される単球増殖剤。

[0012] （２） ＦＩｔ－３Ｌ、ＩＬ－３又はＩＦＮ－γのうちの１つ以上を含み、単球から樹状細胞への分化処理前に使用される単球増殖用培地。

[0013] （３） ＧＭ－ＣＳＦを含む（２）に記載の単球増殖用培地。

[0014] （４） 原料単球を、（２）又は（３）に記載の単球増殖用培地中で培養することによって増殖させる増殖工程を含む単球の製造方法。

[0015] （５） 上記原料単球として、単球及び単球以外の白血球成分を含む混合物を用いる（４）に記載の単球の製造方法。

[0016] （６） 上記増殖工程の前に、体液中の単球以外の成分の含有率を低減させて上記原料単球を得る低減工程を含む（４）又は（５）に記載の単球の製造方法。

[0017] （７） 上記低減は、上記原料単球中の単球及び単球以外の白血球成分、血漿、赤血球の少なくとも１つに対して他方より高い親和性を有する磁気ビーズを使用して行う（６）に記載の単球の製造方法。

[0018] （８） １００ｍＬ以下の末梢血から上記原料単球を得る（６）又は（７）に記載の単球の製造方法。

[0019] （９） 上記単球を凍結保存する凍結保存工程を含まない（６）から（８）のいずれかに記載の単球の製造方法。

[0020] （１０） （４）から（９）のいずれかに記載の単球の製造方法によって単球を製造する単球製造工程と、

上記単球製造工程で得られた単球を樹状細胞へと分化させる分化工程と、を含む樹状細胞の製造方法。

[0021] （１１） 上記分化工程において、上記単球は、ＦＩｔ－３Ｌ、ＩＬ－３又はＩＦＮ－γのうちの１つ以上を含む培地中で培養される（１０）に記載の樹状細胞の製造方法。

[0022] （１２） 上記樹状細胞をパルスするパルス工程を含む（１０）又は（１１）に記載の樹状細胞の製造方法。

[0023] （１３） （１０）から（１２）のいずれかに記載の樹状細胞の製造方法によって樹状細胞を製造する樹状細胞製造工程と、

上記樹状細胞製造工程で得られた樹状細胞を樹状細胞ワクチンに調製する調製工程と、

を含む樹状細胞ワクチンの製造方法。

[0024] （１４） 上記単球及び上記樹状細胞のうち少なくとも一方を凍結保存する凍結保存工程を含まない（１３）に記載の樹状細胞ワクチンの製造方法。

[0025] （１５） 上記原料単球は、上記樹状細胞ワクチンを投与される対象から採取した体液から得たものである（１３）又は（１４）に記載の樹状細胞ワクチンの製造方法。

発明の効果

[0026] 本発明によれば、単球を高効率かつ簡便に増殖させることができる手段が提供される。

図面の簡単な説明

[0027] [図1]末梢血から単球を分離する前（Ａ）、及び、分離した後（Ｂ）における、それぞれの細胞試料（３×10^5ｃｅｌｌｓ）中に含まれる単球数を示す図である。

[図2]本発明の一実施形態にかかる単球増殖剤の存在下で３日間培養し、その後、単球を１１日間培養して樹状細胞に分化させたときの細胞数の経時的変化を示す図である。

[図3]本発明の単球増殖剤によって増殖させた単球が成熟樹状細胞に分化した

ことを示す図（Ａ）及び（Ｂ）、ならびに、（Ａ）及び（Ｂ）において得られた成熟樹状細胞が抗原提示能を有することを示す図（Ｃ）である。

発明を実施するための形態

[0028] 以下、本発明の実施形態について説明するが、本発明を限定することを意図するものではない。

[0029] ＜単球増殖剤＞

本発明の単球増殖剤は、Ｆｌｔ－３Ｌ、ＩＬ－３又はＩＦＮ－γのうちの１つ以上からなり、単球から樹状細胞への分化処理前に使用される。なお、本発明の単球増殖剤の使用態様は特に限定されないが、単球を培養可能な培地に添加され、又は培地の成分としてプレミックスされた形態で用いられるのが一般的と考えられる。

[0030] 「単球から樹状細胞への分化処理」とは、単球を樹状細胞に分化させるのに好適な条件、すなわち、所定量の特定のサイトカイン（ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－４、及びＩＬ－６等）の存在下で単球を培養することを指す。分化処理の過程でも単球数はある程度増加することが知られているが、本発明の単球増殖剤は、この分化処理に用いられるものではなく、その前段階で用いられる。

[0031] 上記各サイトカインについて、単球を樹状細胞に分化させる量は、その量のサイトカインを含む培地で、３７℃、５％ CO_2の条件で６日間培養したときに、全細胞数における樹状細胞の数が２０％以上である量を指し、具体的な量は培地の成分や培養条件により異なる。

[0032] 本発明の単球増殖剤によれば、上記の分化処理に供する前に、樹状細胞ワクチンを製造するのに十分な量（例えば、10^6～10^7ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上）まで単球を増殖でき、樹状細胞ワクチンのために単球の培養工程を何度も繰り返す必要がないため簡便である。

[0033] Ｆｌｔ－３Ｌ（Ｆｌｔ３－Ｌｉｇａｎｄ）、ＩＬ－３（インターロイキン－３）、ＩＦＮ－γ（インターフェロン－γ）は、造血幹細胞の増殖等に関与するサイトカインとして知られているであるが、本願発明者らの検討の結

果、驚くべきことに、効果的に単球を増殖できることが見出された。

[0034] （ＦＩｔ－３Ｌ）

単球を増殖させるために好適なＦＩｔ－３Ｌの量は特に限定されないが、単球を培養可能な培地あたり、１００～１００００ＩＵ／ｍＬ、好ましくは１０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、最も好ましくは１０００～３０００ＩＵ／ｍＬであってもよい。

[0035] （ＩＬ－３）

単球を増殖させるために好適なＩＬ－３の量は特に限定されないが、単球を培養可能な培地あたり、１００～１００００ＩＵ／ｍＬ、好ましくは１００～５０００ＩＵ／ｍＬ、最も好ましくは５００～３０００ＩＵ／ｍＬであってもよい。

[0036] （ＩＦＮ－γ）

単球を増殖させるために好適なＩＦＮ－γの量は特に限定されないが、単球を培養可能な培地あたり、１～１０００ｎｇ／ｍＬ、好ましくは１～５００ｎｇ／ｍＬ、最も好ましくは１～５０ｎｇ／ｍＬであってもよい。

[0037] 本発明の単球増殖剤は、ＦＩｔ－３Ｌ、ＩＬ－３又はＩＦＮ－γのいずれかを単独で使用してもよく、２つ以上を組み合わせてもよい。前述の通り、ＦＩｔ－３Ｌ、ＩＬ－３及びＩＦＮ－γは、類似する機能を有することから、組み合わせて用いても互いの機能を阻害することは想定されない。これらのうち２つ以上を組み合わせる場合、それぞれのサイトカインの配合量は上述の範囲内であってもよく、それより少なくてもよい。

[0038] 本発明の単球増殖剤によって増殖した細胞が単球であるかどうかは、フローサイトメトリーによって、得られた細胞の細胞表面マーカーを解析することで確認する。単球の細胞表面のマーカーとしてはＣＤ１４等が挙げられる。このようなマーカーを有する細胞は単球であると認められる。

[0039] ＜単球増殖用培地＞

本発明の単球増殖用培地は、ＦＩｔ－３Ｌ、ＩＬ－３又はＩＦＮ－γのうちの１つ以上を含み、単球から樹状細胞への分化処理前に使用される。具体

的に、単球増殖用培地は、さらに、単球を培養可能とするための栄養成分、ｐＨ調整剤等を含み得る。かかる成分を含む培地としては、特に限定されないが、リンパ球用無血清合成培地、ＡＩＭ－Ｖ、ＲＰＭＩ－１６４０等が挙げられる。なお、本明細書における「培地」とは、液体化された調製済みの形態のみならず、調製前の成分混合物（通常、粉体）も包含する。

[0040] 本発明の単球増殖用培地は、さらに、単球の分化に関与するサイトカイン（ＧＭ－ＣＳＦ（Ｇｒａｎｕｌｏｃｙｔｅ Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ Ｃｏｌｏｎｙ－Ｓｔｉｍｕｌａｔｉｎｇ Ｆａｃｔｏｒ；顆粒球単球コロニー刺激因子））を含んでいてもよい。

[0041] 単球は、ＧＭ－ＣＳＦの存在下でマクロファージに分化し、ＧＭ－ＣＳＦ及びＩＬ－４の存在下で樹状細胞に分化しやすい傾向がある。しかし、本発明者による検討の結果、ＧＭ－ＣＳＦを含む本発明の単球増殖用培地によれば、単球の増殖を顕著に促進できることが見出された。ＧＭ－ＣＳＦ自体にも、単球の増殖効果があることは従来知られていたものの、ＧＭ－ＣＳＦを含む本発明の単球増殖用培地によれば、単球を分化させることなく、単球の増殖を顕著に促進できる。また、本発明の単球増殖用培地には、ＧＭ－ＣＳＦに加えて、さらに、単球を樹状細胞へと分化させる量（例えば、５００～２，０００ＩＵ／ｍＬ）未満のＩＬ－４を含んでいてもよい。本発明の単球増殖用培地に含まれるＧＭ－ＣＳＦは、５００～２，０００ＩＵ／ｍＬの範囲が挙げられる。

[0042] 本発明の単球増殖用培地には、細胞培養において通常使用される試薬が含まれていてもよい。このような試薬として、抗生物質（ゲンタマイシン、カナマイシン等）、アルブミン、血清（ウシ胎仔血清等）等が挙げられる。また、本発明の単球増殖用培地には、生体（例えば、ヒト、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、カンガルー、サル等の哺乳類動物）由来の自己血漿（つまり、増殖させようとする単球と自己血漿は同じ生体から得られたものであることを意味する）が含まれていてもよい。また、本発明の単球増殖用培地には、樹状細胞への分化誘導を促進するという目的で、塩化ピシバニ

ール、プロスタグランジンＥ２（ＰＧＥ２）等が含まれていてもよい。

[0043] ＜単球の製造方法＞

本発明の単球の製造方法は、原料単球を、本発明の単球増殖用培地中で培養することによって増殖させる増殖工程を含む。

[0044] （増殖工程）

本発明における増殖工程で使用される条件としては、特に限定されないが、多くの単球が分化し始める前に単球を増殖させる観点で、３０～４０℃、２～８％　CO_2の条件で培養してもよい。培養時間は、所要される単球の量によって適宜調整でき、３～２０日、３～１８日、３～１４日、３～１０日であってもよい。培養中、従来公知の方法で適宜培地交換を行ってもよい。

[0045] 本発明の単球の製造方法によれば、例えば１４日間という短い培養時間で、原料単球中の単球を臨床使用可能なレベル（例えば、10^6～10^7ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上）まで増殖できる。臨床使用可能なレベルとは、増殖させた単球を分化させた樹状細胞を樹状細胞ワクチンに調製した場合、得られた樹状細胞ワクチンがそのまま非凍結処理ワクチンとして使用可能なレベルを指す。

[0046] 本発明の単球の製造方法においては、本発明の単球増殖用培地中で単球を培養するという、単球への負荷が少ない条件下で単球を増殖させる。そのため、本発明の単球の製造方法によれば、高い生細胞率（例えば、９０％超）にて単球を得ることが期待できる。

[0047] （原料単球）

本発明における原料単球とは、単球を含む試料である。原料単球は、単球のみからなってもよく、また、本発明の単球の製造方法によれば単球を選択的に効率よく増殖できるため、単球と、単球以外の白血球成分（例えば、リンパ球、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞）とを含む混合物であってもよい。この混合物はさらに血漿、赤血球を含んでいてもよい。混合物としては、血液等の体液の試料から密度勾配遠心分離等で得られる、主に単球及びリンパ球を含む単核球画分であってもよい。

[0048] （低減工程）

上記増殖工程の前に、体液中の単球以外の成分の含有率を低減させて上記原料単球を得る低減工程を行うことが好ましい。低減は、例えば、磁気ビーズを使用した方法、密度勾配遠心法、体液中の成分のうち単球のみをシャーレへ接着させて単球を分離する方法や、これらの方法の組み合わせ等で行うことができる。

[0049] 簡便かつ高収率で単球を回収でき、単球へのダメージが小さい点で、磁気ビーズを使用することが好ましい。この磁気ビーズは、原料単球中の単球及び単球以外の白血球成分、血漿、赤血球の少なくとも１つ（好ましくはすべて）に対して他方より高い親和性を有する磁気ビーズである。かかる磁気ビーズは、磁性を帯びた担体に、分離しようとする物質に対する抗体等が結合した構造を有してよい。また、体液を密度勾配遠心して得られた単核球画分について、磁気ビーズによる処理を行うことは、単球の収率がさらに高まる点で好ましい。

[0050] 単球に対して相対的に高い親和性を有する磁気ビーズを使用すると、体液から主に単球を分離できる（これは、単球の陽性選択と呼ばれる）。分離された単球から従来公知の方法で磁気ビーズを外すことで、原料単球が得られる。この態様は、準備する磁気ビーズの種類が少ない点で有利であるが、磁気ビーズを単球から外す工程が必要であり、単球への損傷が若干懸念され得る。

[0051] 単球以外の白血球成分、血漿、赤血球の少なくとも１つに対して相対的に高い親和性を有する磁気ビーズを使用すると、体液から単球以外の成分を除去することができる（これは、単球の陰性選択と呼ばれる）。その結果、単球を主に含む原料単球が得られる。この態様は、準備する磁気ビーズの種類が多い点で不利となり得るが、磁気ビーズを単球から外す工程が不要であり、良質の単球が確実に得られる点で好ましい。単球の陰性選択が行われる試料は、体液を密度勾配遠心して得られた単核球画分であってもよい。この場合、リンパ球に対して相対的に高い親和性を有する磁気ビーズを使用する。

[0052] 磁気ビーズを使用する場合、磁気細胞分離装置を使用できる。磁気細胞分離装置は、血液等の体液の試料とともに磁気ビーズ等の試薬を装置内にセットすることで、所定のプログラムに基づいて体液から単球を分離する。このような装置の使用は、体液から単球を迅速かつ高収率で分離できる点で好ましい。単球を高収率で分離すると、本発明の単球増殖剤による単球の増殖効率を著しく高めることができる。

[0053] 本発明において好適な磁気細胞分離装置としては、例えば、「ＲｏｂｏＳｅｐ（商標）」（株式会社ベリタス）等が挙げられる。

[0054] （体液）

原料単球を得るための試料として、血液や骨髄液といった体液が挙げられる。血液は、生体（例えば、ヒト癌患者）から採取され、末梢血、臍帯血等が挙げられる。このうち、被採取者の負担軽減の観点で、末梢血が好ましい。体液の採取方法としては特に限定されず、腕、手首、足等の部位から、シリンジ、翼状針等を使用して採取する方法等を使用できる。本発明の単球の製造方法においては、使用する体液の量が少なくて済むため、従来使用されてきたアフェレーシス等の方法と比較して、体液を採取する際の生体に対する負担（費用、時間等）が著しく少ない。

[0055] 従来は、樹状細胞ワクチンの製造のために、例えば３００～４００ｍＬという大量の血液を生体から採取していた。しかし、本発明の単球の製造方法によれば、使用する体液の量は、１００ｍＬ以下、９０ｍＬ以下、８０ｍＬ以下、７０ｍＬ以下、６０ｍＬ以下、５０ｍＬ以下、４０ｍＬ以下、３５ｍＬ以下、３０ｍＬ以下、２５ｍＬ以下、２０ｍＬ以下、１５ｍＬ以下、１０ｍＬ以下、５ｍＬ以下、１ｍＬ以下、０．５ｍＬ以下という少量であってもよい。体液量の下限は特に限定されないが、例えば０．１ｍＬ以上であってよい。

[0056] 本発明の単球の製造方法によって得られた単球は、そのまま分化工程を経て樹状細胞に分化させてもよく、従来公知の方法で凍結保存してもよい。凍結保存された単球は、解凍した後に、単球の分化工程に供することができる

。ただし、分化させることができる単球の損失を防ぐ観点で単球を凍結保存しないことが好ましい。本発明では、分化工程に供することのできる単球を得るために何度も単球の培養を行う必要がないため、単球を凍結保存することなく単球の分化工程に供することができる。

[0057] ＜樹状細胞の製造方法＞

本発明の樹状細胞の製造方法は、本発明の単球の製造方法によって単球を製造する単球製造工程と、上記単球製造工程で得られた単球を樹状細胞へと分化させる分化工程と、を含む。

[0058] （分化工程）

単球を樹状細胞へ分化させる方法自体は、従来公知である。つまり、例えばＩＬ－４等を含む分化用培地中で単球を培養すると、単球は未成熟樹状細胞に分化する。ＴＮＦ－α等を含む培地中で得られた未成熟樹状細胞を培養すると、未成熟樹状細胞は成熟樹状細胞に分化する。本発明における樹状細胞とは、未成熟樹状細胞又は成熟樹状細胞の双方を包含する。

[0059] 本発明の分化工程においても、Ｆｌｔ－３Ｌ、ＩＬ－３又はＩＦＮ－γのうちの１つ以上を含む培地を用いることが好ましい。これにより、単球を増殖させながら樹状細胞へと分化させることができ、より多数の樹状細胞を得ることができる。ただし、増殖工程で得られた単球の数が十分であるとか、所要される樹状細胞の数があまり多くないといった場合には、上記成分を含む培地を用いなくてもよい。

[0060] （パルス工程）

得られた未成熟樹状細胞又は成熟樹状細胞に、癌細胞から抽出した物質（ペプチド等）や癌特異的抗原、人工抗原等を取り込ませる（パルスする）ことで、所望の抗原を提示することのできる樹状細胞を得ることができる。なお、パルス工程は、樹状細胞を製造する過程で行ってもよく、後述のように樹状細胞の製造後のワクチン調製の過程で行ってもよい。

[0061] パルスの方法としては、樹状細胞に所望の抗原を取り込ませることができる方法であれば特に限定されないが、樹状細胞を所望の抗原とともに培養す

ること等が挙げられる。一般に、抗原の取り込みやすさは、成熟樹状細胞よりも未成熟樹状細胞の方が高いため、パルスは未成熟樹状細胞に対して行うことが好ましい。

[0062] 得られた細胞が樹状細胞であるかどうかは、フローサイトメトリーによって樹状細胞の細胞表面マーカーを解析することで確認する。樹状細胞の細胞表面のマーカーとしてはＣＤ８３等が挙げられる。このようなマーカーを有する細胞は樹状細胞であると認められる。

[0063] 本発明の樹状細胞の製造方法によって得られた樹状細胞が抗原提示能を有するかどうかは、フローサイトメトリーによって樹状細胞の細胞表面マーカーを解析することで確認する。抗原提示能を有する樹状細胞の細胞表面のマーカーとしてはＭＨＣクラスＩ分子（ＨＬＡ－Ａ，Ｂ，Ｃ）、及び、ＭＨＣクラスＩＩ分子（ＨＬＡ－ＤＲ）等が挙げられる。このようなマーカーを有する樹状細胞は抗原提示能を有すると認められる。

[0064] ＜樹状細胞ワクチンの製造方法＞

本発明の樹状細胞ワクチンの製造方法は、本発明の樹状細胞の製造方法によって樹状細胞を製造する樹状細胞製造工程と、上記樹状細胞製造工程で得られた樹状細胞を樹状細胞ワクチンに調製する調製工程と、を含む。

[0065] （調製工程）

樹状細胞を樹状細胞ワクチンに調製する方法は特に限定されないが、樹状細胞を、通常のワクチン製剤に処方される薬剤（生理食塩水、リンゲル液等）と混合することが挙げられる。また、パルス工程を経ていない樹状細胞を用いる場合、樹状細胞に対してパルス工程を行う。

[0066] 本発明の樹状細胞ワクチンの製造方法は、単球及び樹状細胞のうち少なくとも一方を凍結保存する凍結保存工程を含まなくてもよい。本発明の樹状細胞ワクチンの製造方法においては、樹状細胞ワクチンを製造できるほどに十分な量の単球や樹状細胞を短期間で得られるため、単球や樹状細胞をストックする必要なく適時調製できる。そのため、必要に応じて製造した単球や樹状細胞を、凍結保存せずに樹状細胞ワクチンの製造に供することができる。

これにより、凍結によって生じる可能性がある細胞の損傷や、樹状細胞の抗原提示能の低下を回避できる。

[0067] 得られた樹状細胞ワクチンは、皮内注射等の従来知られた方法によって生体に投与できる。

[0068] 原料単球は、樹状細胞ワクチンを投与される対象から採取した体液から得たものであることが好ましい。樹状細胞ワクチンを投与される対象に由来する原料単球を使用することで、有害な副作用の少ない樹状細胞ワクチンを得ることができる。ただし、樹状細胞ワクチンの投与によって生じ得る免疫反応が許容されるものである限り、投与される対象ではない者から採取した体液を用いてもよい。

実施例

[0069] 以下、本発明を実施例に基づき説明するが、本発明は下記の実施例に限定されるものではない。

[0070] ＜実施例１；単球の分離＞

３名の癌患者の腕から末梢血を２５ｍＬ採取した。この末梢血を、それぞれ、フィコール溶液（ＧＥヘルスケア・ジャパン株式会社）を用いて、密度勾配遠心を行い、単核球画分の細胞を得た。得られた単核球画分の細胞を、磁気細胞分離装置（商品名；ＲｏｂｏＳｅｐ、株式会社ベリタス）にセットし、単球分離用に設定されたプログラムに従って、ＣＤ１４$^{+}$単球、及びＣＤ１６$^{+}$単球を分離した。

[0071] 単球を分離する前の末梢血、及び、末梢血から単球を分離した後の試料について、各試料中の単球数を下記の条件に従って計測した。

各試料中の３×１０^{5}ｃｅｌｌｓの細胞について、細胞表面のマーカーをフローサイトメトリーによって解析した。なお、マーカーとして単球のマーカーであるＣＤ１４を用いた。その結果を図１に示す。図１に示される通り、単球を分離する前（Ａ）と分離した後（Ｂ）とを比較すると、分離工程によって、試料中の細胞数当たりの単球の個数（分離前；５３４個、分離後；２９３８個）が顕著に増加しており、単球が濃縮された試料が得られたことが

分かる。

[0072] ＜実施例２；単球の増殖＞

上記の方法に従って分離した癌患者由来の単球（ＣＤ１４$^{+}$単球、及びＣＤ１６$^{+}$単球）を、下記の条件に従って、本発明の単球増殖剤（本例ではＦｌｔ－３Ｌを使用した）を含む単球増殖用培地中で培養した。

[0073] （単球増殖用培地の組成）

リンパ球用無血清合成培地（Ｘ－ＶＩＶＯ　１５、タカラバイオ株式会社）

Ｆｌｔ－３Ｌ（Ｃｅｌｌｇｅｎｉｘ社）　２０００ＩＵ／ｍＬ

ＧＭ－ＣＳＦ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ社）　１０００ＩＵ／ｍＬ

ゲンタマイシン　５０ｎｇ／ｍＬ

５％　自己血漿（各癌患者から得られた血漿）

[0074] 上記の単球増殖用培地に、分離された単球を、培地当たり２×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍＬとなるように加え、３７℃、５％　CO_2の条件で３日間培養した。培養４日目に実施例３における単球分化用培地（１）で８日間培養した。培養１２日目に実施例３における単球分化用培地（１）で３日間培養した。つまり、培養期間の合計は１４日間である。

[0075] 培養開始時点、培養３日後、培養６日後、培養１１日後及び培養１４日後の各時点の単球を回収し、トリパンブルー染色し、顕微鏡観察によって、細胞数を計測した。その結果を図２に示す。図２に示される通り、培養３日目の時点で単球が２×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬ程度まで増殖している。この時点で、分化工程に供することが可能である。さらに、分化工程においても本発明の単球増殖剤の存在下で培養することで、１０^{7}ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上の樹状細胞を得ることが期待できる。

[0076] ＜実施例３；単球の分化＞

上記で得られた単球を、下記の条件に従って培養した。

[0077] （単球分化用培地（１）の組成）

単球増殖用培地に、１０００ＩＵ　ＩＬ－４（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ社）を加えることで、単球を未成熟樹状細胞へ分化させるための培地を調製した。以下、この培地を「単球分化用培地（１）」と呼ぶ。

[0078] （単球分化用培地（２）の組成）

単球分化用培地（１）に、さらに下記の成分を加えることで未成熟樹状細胞を成熟樹状細胞へ分化させるための培地を調製した。以下、この培地を「単球分化用培地（２）」と呼ぶ。

ＩＬ－１β（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ社）　１０ｎｇ／ｍＬ

ＩＬ－６（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ社）　１０００ＩＵ／ｍＬ

ＰＧＥ２（Ｃａｙｍａｎ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ社）　１μｇ／ｍＬ

ＴＮＦ－α（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ社）　２０ｎｇ／ｍＬ

０．１ＫＥ　塩化ピシバニール（中外製薬）

ゲンタマイシン　５０ｎｇ／ｍＬ

５％　自己血漿（各癌患者から得られた血漿）

[0079] 増殖した単球（すなわち、実施例２の条件で３日目培養して得られた単球）を、単球分化用培地（１）中で、単球の増殖と同条件にて８日間培養して未成熟樹状細胞に分化させた。８日間の培養の終了時点で、抗原ペプチドを加えてパルスを行った。

[0080] 得られた未成熟樹状細胞を、単球分化用培地（２）中で、単球の増殖と同条件にて３日間培養して成熟樹状細胞に分化させた。

[0081] 得られた成熟樹状細胞について、細胞表面のマーカーを、フローサイトメトリーによって解析した。なお、マーカーとして成熟樹状細胞のマーカーであるＣＤ８３、及び、単球のマーカーであるＣＤ１４を用いた。その結果を図３（Ａ）に示す。また、得られた成熟樹状細胞の数を、マーカーとして成熟樹状細胞のマーカーであるＣＤ８３を用いて、フローサイトメトリーによって解析した。その結果を図３（Ｂ）に示す。図３（Ａ）及び（Ｂ）に示される通り、分化後の細胞中には、ＣＤ１４を発現している細胞（すなわち単球）は存在せず、ＣＤ８３を発現している細胞（すなわち成熟樹状細胞）が

存在することから、単球が成熟樹状細胞に分化したことが分かる。

[0082] また、得られた成熟樹状細胞の抗原提示能を、マーカーとしてＭＨＣクラスＩ分子（ＨＬＡ－Ａ，Ｂ，Ｃ）、及び、ＭＨＣクラスＩＩ分子（ＨＬＡ－ＤＲ）を用いて、フローサイトメトリーによって解析した。その結果を図３（Ｃ）に示す。図３（Ｃ）に示される通り、得られた成熟樹状細胞は、ＭＨＣクラスＩ分子及びＭＨＣクラスＩＩ分子を発現しており、抗原提示能を有することが分かる。

[0083] ＜実施例４；各種サイトカインによる単球の増殖への影響についての検討＞

本発明の単球増殖剤（Ｆｌｔ－３Ｌ、ＩＬ－３又はＩＦＮ－γ）及び各種サイトカイン（ＳＣＦ、ＩＦＮ－α又はＩＦＮ－β）が、単球の増殖へ及ぼす影響を下記の条件に従って検討した。

[0084] 実施例１記載の方法に従って分離した単球を、培地中で、１×１０^{3}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌとなるように９６穴シャーレ内に加え、３７℃、５％ CO_2 の条件で６日間培養した。なお、当該培地の組成は下記の通りである。

（培地組成）

リンパ球用無血清合成培地（Ｘ－ＶＩＶＯ　１５、タカラバイオ株式会社）

表１のマトリックスに従って組み合わせたサイトカイン（各サイトカインの使用量は下記の通りである）

２０００ＩＵ／ｍＬ　Ｆｌｔ－３Ｌ

１０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－３

１０ｎｇ／ｍＬ　ＩＦＮ－γ

１０ｎｇ／ｍＬ　ＳＣＦ

１０ｎｇ／ｍＬ　ＩＦＮ－α

１０ｎｇ／ｍＬ　ＩＦＮ－β

１０００ＩＵ／ｍＬ　ＧＭ－ＣＳＦ

１０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－４

なお、表１中、「増殖因子」とは、本発明の単球増殖剤（Ｆｌｔ－３Ｌ、

ＩＬ－３又はＩＦＮ－γ）及び各種サイトカイン（ＳＣＦ、ＩＦＮ－α及びＩＦＮ－β）を合わせた呼称である。

[0085] 培養終了後の細胞数を顕微鏡下で目視観測し、各種サイトカインによる単球の増殖への影響を、「増殖因子無添加」かつ「ＧＭ－ＣＳＦ及びＩＬ－４無添加」の条件の結果と比較して判定した。その結果を表１に示す。なお、判定基準は以下の通りである。

±：変化なし

＋：単球の増殖をやや促進した

＋＋：単球の増殖を促進した

＋＋＋：単球の増殖を顕著に促進した

[0086] [表1]

	GM-CSF及びIL-4無添加	GM-CSF添加	GM-CSF及びIL-4添加
増殖因子無添加	－	＋＋	＋＋
Flt-3L添加	＋	＋＋＋	＋＋＋
IL-3添加	＋	＋＋＋	＋＋＋
IFN-γ添加	＋	＋＋＋	＋＋＋
SCF添加	±	±	±
IFN-α添加	±	±	±
IFN-β添加	±	±	±

[0087] 表１に示される通り、本発明の単球増殖剤（ＦＩｔ－３Ｌ、ＩＬ－３又はＩＦＮ－γ）によれば、単球の増殖が促進される。また、本発明の単球増殖剤に加えて、さらにＧＭ－ＣＳＦを組み合わせることで単球の増殖は顕著に促進される。

[0088] ＜実施例５；単球の生細胞率についての検討＞

本発明の単球増殖剤によって増殖させた単球を分化させて得られた樹状細胞の生細胞率について下記の条件に従って検討した。

[0089] ２０名の癌患者の腕から末梢血を約２５ｍＬ採取した。得られた末梢血から、実施例１と同様に単球を分離した。次いで、実施例２と同様に単球を増殖させ、得られた単球を実施例３と同様に成熟樹状細胞に分化させた。

[0090] 得られた成熟樹状細胞について、トリパンブルー染色を行い総細胞数（得られた成熟樹状細胞の総数）と生細胞率を計測した。その結果を表２に示す

。なお、生細胞率は下式に基づいて算出した。

生細胞率（％）＝生細胞の総数（未染色細胞の数）／総細胞数（染色細胞の数と未染色細胞の数との合計）×１００

[0091] [表2]

	総細胞数(x10^7)	生細胞率
患者 1	1.05	97.2%
患者 2	1.09	96.5%
患者 3	1.10	97.0%
患者 4	1.15	97.0%
患者 5	1.03	97.0%
患者 6	1.01	97.3%
患者 7	1.03	98.1%
患者 8	1.04	97.3%
患者 9	1.23	97.5%
患者 10	1.04	97.7%
患者 11	1.06	97.9%
患者 12	1.17	96.7%
患者 13	1.10	98.7%
患者 14	1.14	97.8%
患者 15	1.07	97.1%
患者 16	1.12	97.1%
患者 17	1.03	97.9%
患者 18	1.05	98.2%
患者 19	1.11	96.7%
患者 20	1.02	97.8%

[0092] 表２に示される通り、本発明によれば、１．０×１０^{7}以上もの細胞数と約９７％以上の生細胞を安定的に得ることが期待できる。

請求の範囲

[請求項1] ＦＩｔ－３Ｌ、ＩＬ－３又はＩＦＮ－γのうちの１つ以上からなり、単球から樹状細胞への分化処理前に使用される単球増殖剤。

[請求項2] ＦＩｔ－３Ｌ、ＩＬ－３又はＩＦＮ－γのうちの１つ以上を含み、単球から樹状細胞への分化処理前に使用される単球増殖用培地。

[請求項3] ＧＭ－ＣＳＦを含む請求項２に記載の単球増殖用培地。

[請求項4] 原料単球を、請求項２又は３に記載の単球増殖用培地中で培養することによって増殖させる増殖工程を含む単球の製造方法。

[請求項5] 前記原料単球として、単球及び単球以外の白血球成分を含む混合物を用いる請求項４に記載の単球の製造方法。

[請求項6] 前記増殖工程の前に、体液中の単球以外の成分の含有率を低減させて前記原料単球を得る低減工程を含む請求項４又は５に記載の単球の製造方法。

[請求項7] 前記低減は、前記原料単球中の単球及び単球以外の白血球成分、血漿、赤血球の少なくとも１つに対して他方より高い親和性を有する磁気ビーズを使用して行う請求項６に記載の単球の製造方法。

[請求項8] １００ｍＬ以下の末梢血から前記原料単球を得る請求項６又は７に記載の単球の製造方法。

[請求項9] 前記単球を凍結保存する凍結保存工程を含まない請求項６から８のいずれか１項に記載の単球の製造方法。

[請求項10] 請求項４から９のいずれか１項に記載の単球の製造方法によって単球を製造する単球製造工程と、

前記単球製造工程で得られた単球を樹状細胞へと分化させる分化工程と、

を含む樹状細胞の製造方法。

[請求項11] 前記分化工程において、前記単球は、ＦＩｔ－３Ｌ、ＩＬ－３又はＩＦＮ－γのうちの１つ以上を含む培地中で培養される請求項１０に記載の樹状細胞の製造方法。

［請求項12］　前記樹状細胞をパルスするパルス工程を含む請求項１０又は１１に記載の樹状細胞の製造方法。

［請求項13］　請求項１０から１２のいずれか１項に記載の樹状細胞の製造方法によって樹状細胞を製造する樹状細胞製造工程と、

前記樹状細胞製造工程で得られた樹状細胞を樹状細胞ワクチンに調製する調製工程と、

を含む樹状細胞ワクチンの製造方法。

［請求項14］　前記単球及び前記樹状細胞のうち少なくとも一方を凍結保存する凍結保存工程を含まない請求項１３に記載の樹状細胞ワクチンの製造方法。

［請求項15］　前記原料単球は、前記樹状細胞ワクチンを投与される対象から採取した体液から得たものである請求項１３又は１４に記載の樹状細胞ワクチンの製造方法。