

明 細 書

発明の名称：

N K T細胞を刺激する樹状細胞からなる樹状細胞製剤の製造方法

技術分野

[0001] 本願発明は、がん治療、がん予防、健常者の免疫力向上のいずれか一以上に用いる、より副作用の少ないN K T細胞（「T」は、T h y m u s、即ち胸腺を意味する。）を刺激する樹状細胞からなる樹状細胞製剤の製造方法であって、特に受益者自身から採取した細胞を元とする樹状細胞製剤の製造方法、並びにその製造方法に係る樹状細胞製剤を加えた血液に関する。

背景技術

[0002] 近年、N K T細胞を標的とした、がん免疫療法または健常者の免疫力向上法が開発されている。この療法はがん細胞などそのものを標的とせずに、免疫系の司令塔であるN K T細胞を活性化する。活性化されたN K T細胞のアジュバント作用（一部の免疫系細胞を活性化することに起因して他の免疫系細胞の活性化を促し、総合的に免疫系を活性化する作用）によって、強い抗腫瘍効果が現れる。さらに特異的な抗原を標的とするような制限を受けないことにより新たな変異がん細胞にも、がん以外の病原菌やウイルスや寄生虫などに対しても効果が期待できる。

[0003] 特許文献1では、単核球を第1の培養容器に入れ、静置して前記単核球のうちの一部の細胞を容器の底面に定着させ、容器の底面に接着した細胞以外の非接着細胞を回収し保存する。残った底面に付着した細胞のうち単球に対し所定の処理を行い未成熟樹状細胞に分化させ、さらに所定の処理を行って成熟させる。その後、成熟樹状細胞に対して α -Galactosylceramide（以下、 α -ガラクトシルセラミド）を加え、成熟した樹状細胞から、N K T細胞を刺激する樹状細胞を誘導し、保存しておいた非接着細胞と共に第2の培養容器に入れて培養し前記非接着細胞の一部からN K T細胞を誘導する方法が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特許第6854290号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 特許文献1には、NK T細胞が活性化すると大量のIFN- γ （インターフェロンガンマ）を産生することと、抗原提示細胞（樹状細胞）表面のCD-1d分子が提示された場合、NK T細胞表面のT細胞受容体を介して活性化シグナルが伝達され、NK T細胞が活性化すると知られていると、記載されている。

[0006] 特許文献1に開示されているNK T細胞を刺激する樹状細胞とNK T細胞を含む細胞組成物については、NK T細胞の割合が示されているが、がん細胞に対する多様な効果を生じさせるIFN- γ の産生量に関しては開示されていないので、その効果が明確とは言えない。また、NK T細胞を刺激するための誘導を樹状細胞が成熟化してから行うとしている。しかしながら誘導を行うタイミングと、成熟化したタイミングとの時間的な関係性に関して検討した記載が無い。

[0007] このような課題を解決するために、本願発明者が研究開発を進めるなかで、特許文献1の方法よりもより多くの量のIFN- γ を産生し、IFN- γ の産生がより早く始まる本願発明製剤を見出した。本願発明は、NK T細胞を刺激するための誘導を樹状細胞に対して行うタイミングを検討した結果、先行技術（特許文献1）よりもNK T細胞が産生するIFN- γ の量を多くできる。産生されたIFN- γ は、人体内の自然免疫系、獲得免疫系双方の経路を刺激し活性化するために、大量に産生されたIFN- γ の刺激を受けた両経路からのより大きな効果を、がん治療などにおいて期待することができ、より高い治療効果を期待することができるNK T細胞を刺激する樹状細胞からなる樹状細胞製剤の製造方法を提供するものである。

課題を解決するための手段

[0008] 最初に課題を解決するための手段を要約すると、樹状細胞に対するリガンドのパルスタイミングは、樹状細胞が未成熟である段階で行うことが効果をより大きくする。また、未成熟樹状細胞に対してリガンドをパルスするタイミングは未成熟段階であればいつでも良い、というものでなく、未成熟段階でも所定のタイミングでパルスすることによって大きな効果を得ることが出来る。以下に具体的に解決手段を記載する。

[0009] 以上のような樹状細胞製剤に関する課題を解決するために、本願では第一の発明として、

がん治療、がん予防、免疫力向上のいずれか一以上を目的としたナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞を刺激する樹状細胞からなる樹状細胞製剤の製造方法であって、

（１）受益者から採取（成分採血又は採血された単球又は単球を含む末梢血）された単球を液体培地を用いた培養容器に入れ、静置して前記単球のうちの一部の細胞を容器の内面に接着させる接着工程と、

（２）培養容器の内面に接着した細胞以外の単球を含む非接着細胞を除去する非接着細胞除去工程と、

（３）前記培養容器に所定の因子を入れて、前記培養容器内面に接着した単球を未成熟樹状細胞に分化させる分化工程と、

（４）前記未成熟樹状細胞が非接着状態で存在する培養容器に α -ガラクトシルセラミドをパルスするパルス工程と、

（５）未成熟樹状細胞から、ＮＫＴ細胞を刺激する樹状細胞であるＮＫＴ刺激樹状細胞を誘導するＮＫＴ刺激樹状細胞誘導工程と、

を含むことを特徴とする、前記単球を採取した受益者の体内に戻入するＮＫＴ細胞を刺激する樹状細胞製剤の製造方法を提供する。

[0010] さらに第二の発明として、第一の発明を基礎として、第一の発明の（４）のパルス工程は、（３）の分化工程にて所定の因子を加えた日を０日として、３日乃至は４日目に行う樹状細胞製剤の製造方法を提供する。

- [0011] さらに第三の発明として、第一の発明を基礎として、第一の発明の（４）のパルス工程は、（３）の分化工程にて所定の因子を加えてから６０時間後乃至は１０８時間後に行う樹状細胞製剤の製造方法を提供する。
- [0012] さらに第四の発明として、第一の発明を基礎として、（４）のパルス工程は、（１）の接着工程にて受益者から採取された単球を培養容器に入れた日を０日として、４日目乃至は５日目までに行う請求項１に記載の樹状細胞製剤の製造方法を提供する。
- [0013] さらに第五の発明として、第一の発明を基礎として、（４）のパルス工程は、（１）の接着工程にて受益者から採取された単球を培養容器に入れてから８４時間後乃至は１３２時間後までに行う、樹状細胞製剤の製造方法を提供する。
- [0014] さらに第六の発明として、第一の発明を基礎として、（４）のパルス工程は、（２）の非接着細胞除去工程にて培養容器の内面に接着した細胞以外の単球を含む非接着細胞を除去した日を０日として、４日目乃至は５日目に行う、樹状細胞製剤の製造方法を提供する。
- [0015] さらに第七の発明として、第一の発明を基礎として、（４）のパルス工程は、（２）の非接着細胞除去工程にて培養容器の内面に接着した細胞以外の単球を含む非接着細胞を除去してから８４時間後から１３２時間後までに行う、樹状細胞製剤の製造方法を提供する。
- [0016] さらに第八の発明として、第一の発明から第七の発明のいずれかーを基礎として、（４）のパルス工程においてパルスする α -ガラクトシルセラミドの濃度は３００～１０００ ng/mLである樹状細胞製剤の製造方法を提供する。
- [0017] さらに第九の発明として、第一の発明から第七の発明のいずれかーに記載の製造方法にて製造された樹状細胞製剤を加えた受益者の血液を提供する。
- [0018] さらに第十の発明として、第八の発明の記載の製造方法にて製造された樹状細胞製剤を加えた受益者の血液を提供する。

発明の効果

[0019] 本願発明の、単球を採取した受益者の体内に戻入する、NK T細胞を刺激する樹状細胞製剤の製造方法によれば、先行技術（特許文献1）よりもNK T細胞が産生するIFN- γ の量を多くできる。産生されたIFN- γ は、人体内の自然免疫系、獲得免疫系双方の経路を刺激し活性化するために、大量に産生されたIFN- γ の刺激を受けた両経路からのより大きな効果を、がん治療などにおいて期待することができ、より高い治療効果を期待することができるNK T細胞を刺激する樹状細胞からなる樹状細胞製剤の製造方法を提供するものである。

図面の簡単な説明

- [0020] [図1]実施形態2の樹状細胞製剤製造時の α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングと共培養後のNK T細胞数比率との関係を示すグラフ
- [図2a]実施形態2の樹状細胞製剤製造時の α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングと、各条件での共培養後のNK T細胞数最大比率との関係を示すグラフ1（分化用所定因子添加日を0日とした場合）
- [図2b]実施形態2の樹状細胞製剤製造時の α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングと、各条件での共培養後のNK T細胞数最大比率との関係を示すグラフ2（培養開始した時を起点とした場合）
- [図3]実施形態3の樹状細胞製剤製造時の α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングと共培養後のNK T細胞数比率との関係を示すグラフ
- [図4a]実施形態3の樹状細胞製剤製造時の α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングと、各条件での共培養後のNK T細胞数最大比率との関係を示すグラフ1（分化用所定因子添加日を0日とした場合）
- [図4b]実施形態3の樹状細胞製剤製造時の α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングと、各条件での共培養後のNK T細胞数最大比率との関係を示すグラフ2（培養開始した時を起点とした場合）
- [図5]実施形態4の樹状細胞製剤製造時にパルスする α -ガラクトシルセラミドの濃度と共培養後のIFN- γ 産生量との関係を示すグラフ
- [図6]本願発明の樹状細胞製剤を人体に使用した場合のNK細胞活性値とIFN- γ

N- γ 産生量

[図7]先行技術（特許文献1）と本願発明での発明の効果（共培養後のI F N- γ 産生量）の比較図

発明を実施するための形態

[0021] 先ず、本願発明の実施形態の説明に先立ち、体の免疫に関して説明する。

以下本明細書中では、本願発明の製剤のがん細胞に対する効果を例として説明するが他の病原体などに対しても同様の効果を得ることができる。免疫は、もともと生物が持っている自然免疫と、あとから獲得する獲得免疫に分けられる。

[0022] 自然免疫は、生まれつき人間の体に備わっている免疫で、細菌やウイルスなどの異物を食べて除去する食細胞を中心に構成されている。食細胞は分子や構造を認識する受容体を持っており、異物の処理・排除を行うタイプと、細胞間で信号の伝達を行う役割を担うものと大別される。自然免疫細胞としては、好酸球、好中球、好塩基球、マクロファージ、樹状細胞、NK（ナチュラルキラー）細胞が該当する。

[0023] 一方で、獲得免疫は、体内の病原体を記憶し、再度遭遇した時に、効果的に排除できるようになる免疫である。自然免疫に比べると応答時間がかかるが、さまざまな病原体に反応する多様性を持っている。獲得免疫細胞としては、B細胞とT細胞があり、T細胞はさらにヘルパーT細胞、キラーT細胞、制御性T細胞がある。B細胞は状態に応じて、形質細胞、メモリーB細胞に変化する。

[0024] さらに、自然免疫と獲得免疫の両方を賦活するNK T細胞もある。

前述の免疫細胞の中で、本樹状細胞製剤が直接的に作用する細胞としては、NK T細胞であるが、NK T細胞の活性化によって産生されるI F N- γ のアジュバント作用より、併せて、NK細胞、樹状細胞、T細胞（ヘルパーT細胞、キラーT細胞）、B細胞、なども活性化される。

[0025] 以降、本樹状細胞製剤の製造方法で生成される樹状細胞製剤の作用に関わる免疫細胞と免疫機能に係る物質について簡単に説明する。

[0026] <免疫細胞と免疫機能に係る物質の用語の説明>

<用語説明：抗原>

体に入ってきた異物で、獲得免疫細胞が攻撃対象として認識するための目印になるものである。がん抗原の場合は、正常な細胞には存在しないタンパク質の構造を目印に免疫細胞が攻撃対象として認識する。

[0027] <用語説明：抗体>

免疫グロブリンと呼ばれるたんぱく質の総称で、がん抗体はがん細胞のがん抗原と結合し、以下3つの作用でがん細胞を攻撃する。

中和作用：がん細胞の増殖を妨げる作用

A D C C 活性：キラーT細胞やNK細胞の目印となりがんの攻撃を補助する作用

C D C 活性：がん細胞のがん抗原と結合した抗体に補体（体内で合成され血清中に存在するタンパク質の一種で、感染防御など免疫反応に関与する物質であり、C 1 からC 9 までの9種ある）が結合して、連鎖的にC 1 からC 9 の補体を活性化し、がん細胞の細胞膜に穴をあけて傷害、死滅させる作用

[0028] <用語説明：サイトカイン>

免疫細胞から分泌されるタンパク質であり、細胞間の作用に関与する生理活性物質の総称である。対象となる細胞にシグナルを伝達し、細胞の活性化、細胞の増殖、分化、細胞死、機能発現など様々な細胞応答を引き起こす。インターロイキンやインターフェロンや腫瘍壊死因子などはサイトカインの一種である。

[0029] <用語説明：サイトカイン：インターロイキン>

サイトカインの一種であるインターロイキンは、現在では30種類以上が確認されている。特に、体内の異物と戦う白血球の一種であるリンパ球や、マクロファージや好中球などの貪食細胞から多く分泌される。インターロイキンはインターロイキン-2のような数字名称で呼ばれている（以下、インターロイキンをILと略記する。例：インターロイキン-4はIL-4）。例えば、インターロイキンについていくつか産生元と作用について以下記載

する。

[0030] <用語説明：サイトカイン：インターロイキン：IL-4>

IL-4はTh2サイトカインの一つであり、活性化2型ヘルパーT細胞（Th2細胞）やNK細胞などから産生される。抗原提示細胞の増殖や分化を促進する。B細胞、T細胞、マクロファージ、単球などに影響を及ぼす。ナイーブT細胞はIL-4やIL-13などのサイトカインの刺激を受けてTh2細胞へ分化する。IL-4が活性化B細胞に作用すると、産生される免疫グロブリン（抗体）がIgMからIgEおよびIgG1へと変わるクラススイッチが起こる。このように液性免疫系に係る。

NK細胞は、抗原提示細胞（樹状細胞）が提示する α -ガラクトシルセラミドを認識すると活性化され、IL-4とIFN- γ を産生する。

[0031] <用語説明：サイトカイン：インターロイキン：IL-12>

IL-12は、食細胞（動物体内で組織間を遊送し食作用を有する細胞性免疫を担う細胞：マクロファージや単球、好中球など）や樹状細胞によって産生される。NK細胞刺激因子であり、IFN- γ とともにナイーブT細胞へ働きかけヘルパーT細胞の1種であるTh1細胞へ分化させる。Th1細胞はIFN- γ などのTh1サイトカインを産生しマクロファージやキラーT細胞などを活性化する細胞性免疫に関与する。

α -ガラクトシルセラミドは、樹状細胞（抗原提示細胞）にIL-12を産生させる。抗原提示細胞から産生されたIL-12は、NK細胞に作用しIFN- γ を産生させたり、NK細胞表面のFasリガンドを介して、Fas抗原（Fas受容体）を発現している標的細胞に対し細胞障害活性を示させたりする。

[0032] <用語説明：サイトカイン：インターフェロン>

サイトカインの一種であるインターフェロンは、がん細胞やウイルスに感染した細胞などを攻撃するNK細胞や、マクロファージを活性化させ、ウイルスや腫瘍細胞の増殖を抑制する働きや、がん細胞の貪食を促す作用（アジュバント作用）がある。抗ウイルス薬や抗がん剤としても国の承認を受けて

おり、多発性骨髄腫、脳腫瘍、腎がんの治療に使用されている。

[0033] <用語説明：サイトカイン：インターフェロン：IFN- γ >

IFN- γ は自然免疫系と獲得免疫系に重要なサイトカインである。IFN- γ は自然免疫応答の一部として主にNK細胞とNK T細胞によって産生され、抗原特異的免疫の誘導後はTh1細胞、キラーT細胞、マクロファージなどによって産生される。大量に侵入してきた非自己抗原のプロセッシングを加速させ、細胞性免疫反応を亢進させる。マクロファージの重要な活性化因子であり、刺激して細菌を貪食殺菌させる。NK細胞活性を促進し、またナイーブT細胞をTh1細胞へ分化させる。

[0034] <用語説明：サイトカイン：腫瘍壊死因子>

腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF) は、リンパ球などの細胞から分泌される、腫瘍細胞を壊死させる物質である。ほとんどの悪性細胞に作用するほか、免疫作用を促進する。狭義にはTNF- α 、TNF- β (リンホトキシン (LT)- α) およびLT- β の3種類である。

[0035] <用語説明：サイトカイン：腫瘍壊死因子：TNF- α >

TNF- α は主にマクロファージにより産生されており、固形がんに対して出血性の壊死を生じさせるサイトカインとして発見された。一般には腫瘍壊死因子といえばTNF- α を指すことが多い。細胞接着分子の発現やアポトーシスの誘導に関与する。アポトーシスとは、管理・調節された細胞の自殺すなわちプログラムされた細胞死のことを意味する。

[0036] <用語説明：NK細胞>

NK細胞は、異常な細胞をキャッチする様々な受容体を持っており、ウイルスに感染した細胞やがん細胞など、通常の人体を構成する細胞とは異なる細胞を発見する（人体を構成する細胞を記憶している。）と、それを異常と認識し異常な細胞を傷害する作用を持つ。

[0037] <用語説明：樹状細胞>

抗原提示細胞である。異物（病原菌やウイルスに感染した細胞やがん細胞

など）取り込み（貪食）によってその異物特有の抗原提示能力を獲得、又は、マクロファージ等から抗原を提示されることでその抗原提示能力を獲得する。そして、その抗原をT細胞に提示し攻撃対象として認知させる役割を持っている。樹状細胞は、ウイルスやがん細胞を食する貪食作用を有し、これによって抗原を獲得し、他の免疫細胞に抗原を提示する能力を得る。初期の樹状細胞（未成熟樹状細胞）は抗原を取り込む能力（貪食作用）を持つがナイーブT細胞を活性化できない（抗原提示能力がないといえる）。成熟した成熟樹状細胞は、成熟化によってT細胞を活性化する抗原提示能力を獲得するが抗原を取り込む能力（貪食）を失っている。

[0038] ＜用語説明：ヘルパーT細胞＞

樹状細胞などから抗原を提示されることで攻撃対象として認識し、キラーT細胞に攻撃を指示する。また、サイトカインを生成してB細胞を活性化する。さらに、B細胞から抗原を提示されることでその抗原が危険な異物のものであるか判断し、その結果をB細胞に伝達する。さらに、抗体産生を補助したりする働きがある。

[0039] ＜用語説明：キラーT細胞＞

キラーT細胞は、MHCクラスI分子（MHCクラスI分子は、主にプロテアソーム（タンパク質分解酵素複合体）による細胞質タンパク質の分解によって生じたペプチドを結合する（人間である自分自身を示す目印として）。その後、MHC I ペプチド複合体は小胞体膜を経て細胞膜の外側へ挿入される。エピトープとなるペプチドはMHC I ペプチド分子の細胞外部分に結合している。このようにしてMHC I ペプチド分子は細胞内のタンパク質をキラーT細胞へ提示する。しかし、MHC I ペプチド分子が外来タンパク質から形成されたペプチドを提示することもあり、この過程は交差提示として知られている。）によって提示された抗原を認識し、自己・非自己を認識し、非自己である細胞を傷害する。ちなみに自己・非自己の認識能力は胸腺における能力教育（負の選択）によって与えられ、MHC I ペプチド分子によってその能力が使われる。このように獲得免疫であるT細胞の応答は、MH

C分子による抗原ペプチドの抗原提示から始まる。

ヘルパーT細胞の指示で、キラーT細胞はウイルスに感染した細胞やがん細胞など、生体にとって、危険または不要な細胞を殺傷し除去する。

[0040] <用語説明：B細胞>

ヘルパーT細胞が産生するサイトカインにより刺激され、抗体を生成する。抗原が排除されてもメモリーB細胞となって抗原を記憶し、次の侵入に備える役割がある。

[0041] <用語説明：NK T細胞>

T細胞と、NK細胞の両方の特徴を併せ持つ細胞である。活性化されると、サイトカイン（IFN- γ ）を産生し、免疫賦活・抑制療法の反応を誘導する働きもある。また最も本件発明の製剤によって期待される効果は、アジュバント作用であり、体内の各種の免疫細胞を活性化するとともに、ここが重要な点であるが、増殖させる作用がある。

[0042] <NK T細胞を刺激する樹状細胞製剤の作用>

本製剤によってNK T細胞が活性化されることによって期待される主な効果は、樹状細胞の成熟促進作用、アジュバンド作用（各種免疫細胞の活性化、増殖）、がん細胞のアポトーシス誘導作用、血管新生阻害作用等の、非特異的免疫と特異的免疫の双方の作用がある。アポトーシスとは、管理・調節された細胞の自殺すなわちプログラムされた細胞死のことを意味する。

[0043] 以上述べたように、自然免疫系を活性化する、NK T細胞刺激樹状細胞製剤を使用することで、体内のさまざまな免疫機能を活性化しがん細胞を攻撃することができる。

[0044] 以下に、詳細に実施形態を説明するが、製造方法の途中で使用する物質に関しては、全実施形態において共通である。製造元等は初出時のみ記載する。

[0045] <実施形態1：概要>主に請求項1

受益者から採取（成分採血又は採血された単球、又は単球を含む末梢血）された単球から、NK T細胞を刺激する樹状細胞と変化せしめ、樹状細胞製

剤とする製造方法である。

[0046] 以下、本明細書中では、「受益者」とは、がん治療、がん予防、免疫力向上のいずれか一以上を目的とした樹状細胞製剤の投与による効果の益を得ることを望む者であり、前記製剤の原料となる自身の単球を提供する者をいう。

[0047] <実施形態 1：製造方法>

まず、本願発明のNK T細胞刺激樹状細胞製剤製造方法の概要について説明する。次に本製剤の作用について、以下説明する。

[0048] <実施形態 1：（1）接着工程：単球の準備>

受益者から採取（成分採血又は採血された単球、又は単球を含む末梢血）された単球を準備する。「準備」とは受益者から採取（成分採血又は採血された単球、又は単球を含む末梢血）された単球を製造現場へ搬入することであり、採血自体は含まない。この接着工程で、後で使用する培養容器や液体培地を製造現場へ搬入し使用できるように整えることも準備に含めてもよい。なお本明細書では特記しない限り、「培養容器」とは、内部に液体培地などの培地を収容している培養用の容器をいう。

[0049] 「成分採血」とは、血液を体外に取り出して、専用の機器で血液中から目的の血液成分・因子を分離して再度体内に戻すものである。本願発明では、血液成分として単球を含む末梢血単核球を分離して約100ccの血液成分を採取する。前記単球を含む末梢血単核球の分離後の血液成分には目的とした前記血液成分以外にも、血漿や血小板が含まれている。成分採血は、血液が凝固しないように単球を含む末梢血単核球分離前に血液中に抗凝固剤を混ぜその後その抗凝固剤が体内に戻されたり、単球を含む末梢血単核球分離のための成分採血に長時間かかったりと、体への負担が大きい。

[0050] なお、成分採血での採取ではなく、末梢血で採血100～400mLを行ってもよい。単球を含む割合は成分採血の方が多いが、抗凝固剤を使用せず短時間で採血できるため、末梢血での採血でもよい。

[0051] <実施形態 1：（1）接着工程：静置>

次に採取した単球を含む末梢血単核球から、Ficoll（登録商標）を用いた比重遠心法にて単核球を採取する。（Ficoll（登録商標）はFicoll-Paque（登録商標）の一部であり、血液をその成分（赤血球、白血球など）に分離するために使用される。）採取した単核球を、液体培地を入れた培養容器に入れる。受益者から採取した単核球は採取から72時間以内をめどに培地（液体培地が好ましい）が入った培養容器へ入れることが望ましい。単球を含む単核球を、培地を入れた培養容器（液体培地が好ましい）へ入れた時点を培養開始時点とする。以下本願明細書では特記しない場合には、「単球を培養容器へ入れた」といった表記の場合には培地（液体培地が好ましい）の入った培養容器へ入れたことを意味する。滅菌された37℃恒温環境下で30分ほど静置しインキュベートする。静置以降の工程は特に記さない限り滅菌された37℃恒温環境下で行う。静置時間は30分より長くてもよい、30分より短いと十分な数の単球が容器内面に接着しきれないため、少なくとも30分程度は静置することが好ましい。

[0052] 本願明細書において、培養容器内面に「接着」とは、故意に細胞を培養容器内面に接するように押し付けたり、何らかの物質を接着剤のような役割のために用いて細胞を容易には培養容器内面から離れられないように貼り付けたりすることを意味しない。「接着」は重力以外の外部からの力を加えなくとも細胞が内面に接した後に、そのまま内面に接したままの状態を維持することを指す。

[0053] <実施形態1：（2）非接着細胞除去工程：非接着細胞の除去>

前記静置後（例：30分静置）に、培養容器内面に接着せずに液体培地中に浮遊する単球を含む非接着細胞を除去する（別の容器に移す）。容器の内壁面に接着した細胞（単球分画）が液体培地が入った培養容器内に残る。

[0054] 取り除いた単球を含む非接着細胞は、別途培養しておくか、または凍結保存しておくことが好ましい。取り除いた非接着細胞（NK細胞を含む）は、製造した製剤と共培養することで、製剤の効能検証に用いることができる。非接着細胞を取り除いた後で、容器の内壁面に接着した細胞（単球分画）

を剥離して液体培地中に浮遊させる剥離工程を設けてもよい。前記静置では単球が主に容器内面に接着するため、剥離後は主に単球が液体培地中を浮遊する。

[0055] <実施形態1：(3)分化工程：単球から未成熟樹状細胞への分化>

非接着細胞を取り除いた上記液体培地が入った培養容器へ、単球を未成熟樹状細胞へ分化させるための所定の因子として、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; 以下、GM-CSF) 50 ng/mL (30 ng/mL から 70 ng/mL 程度がよい。これより少ないと刺激が弱すぎて分化が遅くなり、これより多くても分化速度は頭打ちとなってしまうコスト的に不合理) と、インターロイキン4 (以下、IL-4) 50 ng/mL (30 ng/mL から 70 ng/mL 程度がよい。これより少ないと刺激が弱すぎて分化が遅くなり、これより多くても分化速度は頭打ちとなってしまうコスト的に不合理) を添加する。添加後、培養を継続する。GM-CSF と IL-4 を添加し単球を刺激したことによって、培養中の単球が未成熟樹状細胞へと分化する。なお、分化の刺激に用いる物質は、上記の GM-CSF と IL-4 が好ましいが限定されない。刺激物質を添加したことにより、培養容器内は未分化の単球や成熟樹状細胞よりも未成熟樹状細胞が非常に多く存在 (優位に存在) する状態となる。分化した未成熟樹状細胞は、培養容器内の細胞の過半数を占め、好ましくは 80% 以上を占め、より好ましくは 90% 以上を占める。

[0056] <実施形態1：(4)パルス工程： α -ガラクトシルセラミドのパルス>

前記のように未成熟樹状細胞が過半数存在する培養容器中の液体培地へ、 α -ガラクトシルセラミドをパルスする。 α -ガラクトシルセラミドは、協和キリン株式会社の型名 KRN7000 を使用した。 α -ガラクトシルセラミドをパルスされたことにより、未成熟樹状細胞は、成熟後に NK T 細胞を刺激しうる未成熟樹状細胞となる。 α -ガラクトシルセラミドは NK T 細胞を活性化させるために必要な糖脂質抗原である。本願発明の特徴は、この α -ガラク

トシルセラミドを未成熟樹状細胞に直接的に付与する点である。一般的には成熟樹状細胞が各種異物の貪食によって α -ガラクトシルセラミドの抗原提示能力を得るのであるが、本願発明では未成熟段階で樹状細胞へ α -ガラクトシルセラミドを付与（パルス）することで成熟後の樹状細胞に抗原提示能力を与える点に特徴がある。本願発明者らは、先行技術である特許文献1には成熟樹状細胞に α -ガラクトシルセラミドをパルスすることで抗原提示能力を付与するとの記載があるが、本願発明によれば、少なくとも未成熟樹状細胞にパルスした方が、NK T細胞へ抗原提示し活性化する効果が高いことを確認している。

[0057] <実施形態1：（5）NK T刺激樹状細胞誘導工程：樹状細胞の成熟化>

前記のように α -ガラクトシルセラミドをパルス後に、GM-CSF（5 ng/mL：3 ng/mLから7 ng/mL程度がよい。これより少ないと刺激が弱すぎて成熟化が遅くなり、これより多くても成熟速度は頭打ちとなってしまうコスト的に不合理）とIL-4（5 ng/mL：3 ng/mLから7 ng/mL程度がよい。これより少ないと刺激が弱すぎて成熟化が遅くなり、これより多くても成熟速度は頭打ちとなってしまうコスト的に不合理）とOK-432（10 ng/mL：7 ng/mLから13 ng/mL程度がよい。これより少ないと刺激が弱すぎて成熟化が遅くなり、これより多くても成熟速度は頭打ちとなってしまうコスト的に不合理）とPGE2（50 ng/mL：30 ng/mLから70 ng/mL程度がよい。これより少ないと刺激が弱すぎて成熟化が遅くなり、これより多くても成熟速度は頭打ちとなってしまうコスト的に不合理）とを前記培養容器中の液体培地へ添加する。これら4種を添加するのは、培養開始から6日目が良い。添加された前記成分からの刺激を受けて、未成熟樹状細胞は成熟化し成熟樹状細胞となる。なお、OK-432は中外製薬株式会社製造の商品名ピシバニールであり、PGE2はプロスタグランジンE2（英：Prostaglandin E2，以下PGE2）である。なお、成熟化の刺激に用いる物質は、上記のGM-CSFとIL-4とOK-432とPGE2が好ましいが限定されない

。

[0058] <実施形態 1 : (5) NK T 刺激樹状細胞誘導工程 : 最終検査>

成熟樹状細胞としたあと、人に注射投与しても安全か否かを確認するための無菌試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験を行う。さらに、表面マーカー測定を実施し、樹状細胞の品質評価を行う。これらの品質確認検査は、他項目の検査を適宜追加実施してもよい。また、受益者への投与をすぐに行わなかったり、何度かに分けて投与する計画であったりする場合など、必要に応じて製造した樹状細胞を回収し凍結保存液を用いて 0.5×10^7 個以上 / ml / バイアル (全血を原料とする場合は 0.5×10^6 個以上 / ml / バイアル) となるよう調製し、液体窒素下で凍結保存する。バイアルとは注射剤を入れる容器の1つであり、日本薬局方では密封容器に分類される。所望の効果をを得るためには前記の濃度以上とすることが好ましい。ここまですが本願発明のNK T細胞を刺激する樹状細胞製剤の製造方法である。

[0059] <実施形態 1 : NK T 細胞を刺激する樹状細胞製剤の効果>

本願発明のNK T細胞を刺激する樹状細胞製剤を採血した受益者へ使用した場合、受益者体内では、本願発明製剤が $V\alpha 24$ - NK T細胞を刺激し活性化させサイトカインの1種である $IFN-\gamma$ を産生させることによって、アジュバンド作用が生じる。NK細胞は強くそのアジュバンド作用を受けて活性化し、細胞障害性応答によりがん細胞、または正常細胞以外の細胞を攻撃する。活性化NK T細胞が体内の未成熟樹状細胞の成熟化を促すことにより獲得免疫系も活性化させる。自然免疫系および獲得免疫系の両方を活性化することによって、がんの治療のみならず、がんの予防、健常者の免疫力向上による疾病罹患の予防などにも効果がある。

[0060] 次に本願発明のNK T細胞を刺激する樹状細胞製剤を、前記製剤を製造するために単球を採取した受益者の体内に戻入した場合の効果を説明する。

[0061] <実施形態 1 : 本製剤の作用 : 体内への戻入 静脈内点滴>

未熟樹状細胞時に α -ガラクトシルセラミドをバルスされた後に成熟化した樹状細胞を含む本製剤が受益者体内に、静脈内点滴などの方法により戻入

される。

[0062] <実施形態1：本製剤の作用：V α 24-NK T細胞の活性化>

体内の血管を通り、本願発明製剤の樹状細胞は、取り込んだ糖脂質抗原である α -ガラクトシルセラミドをCD1dというリガンドに結合し、体内のV α 24-NK T細胞へ提示する。体内のV α 24-NK T細胞は、受容体に α -ガラクトシルセラミドが結合し（抗原提示を受けて）活性化する。

[0063] <実施形態1：本製剤の作用：活性化NK T細胞：TNF- α 産生、血管新生阻害>

活性化したV α 24-NK T細胞はTNF- α (tumor necrosis factor- α ：腫瘍壊死因子のひとつ) を産生し、未熟樹状細胞（未熟DC）を刺激する。同時にTNF- α により、がん細胞に対し血管新生阻害を働きかける。

[0064] <実施形態1：本製剤の作用：樹状細胞の成熟化と、獲得免疫系の活性化>

がん細胞又は死亡したがん細胞が放出したがん抗原であるネオアンチゲンを未成熟樹状細胞が貪食する。または活性化V α 24-NK T細胞からのTNF- α にて刺激された未成熟樹状細胞がネオアンチゲンを貪食する。ネオアンチゲンを貪食した樹状細胞はTNF- α の刺激の効果もあって成熟化する。成熟化した樹状細胞から刺激としてキラーT細胞とヘルパーT細胞が抗原提示を受ける。抗原提示を受けたヘルパーT細胞はB細胞をサイトカインで刺激する。刺激を受けたB細胞はがん細胞特異抗体を産生して放出する。

[0065] <実施形態1：本製剤の作用：アポトーシス、細胞傷害活性>

活性化V α 24-NK T細胞が産生したIFN- γ により刺激を受けたNK細胞は活性化する。そして活性化NK細胞、活性化V α 24-NK T細胞は、受益者自身の細胞ではないがん細胞（または病原体）に対して殺傷（細胞傷害性活性）したり、アポトーシスを促進させたりする攻撃を行う（自然免疫系）。一方前記B細胞から放出された抗体はがん細胞に結合する。キラーT細胞は、抗体が結合したがん細胞（病原体でもよい）の細胞膜に穴をあけてがん細胞を壊死（細胞障害性活性）させたり、TNF- β （腫瘍壊死因

子、サイトカインの1種)などの物質を産生しアポトーシスを促進させたりする攻撃を行う(獲得免疫系)。活性化NK細胞、活性化 $V\alpha 24$ -NK T細胞からの攻撃(自然免疫系)は、本製剤静脈内点滴後1~2日で起きるが、キラーT細胞からの攻撃(獲得免疫系)は樹状細胞からの抗原提示後となるため、7~14日後くらいと時間を要する。

[0066] がん細胞への攻撃を行ったキラーT細胞や、ヘルパーT細胞は長期間生存することはできないが、前記T細胞の一部は、リンパ節などで記憶キラーT細胞や記憶ヘルパーT細胞として存在する(記憶を持つT細胞の複製と交換が行われ維持され则认为られている)。一旦がん細胞が消失した後であっても、再度同じ抗原を示すがん細胞が再発生した場合には、前記の記憶ヘルパーT細胞が前回の記憶を持つためにすぐに免疫細胞へ攻撃の指示を出し、キラーT細胞も迅速に反応できる。T細胞以外に、抗体を放出したB細胞も同様に記憶B細胞として存在し、再発時には速やかに抗体を放出することができる。

[0067] <効果>

NK T細胞を刺激する樹状細胞を製造することにより、受益者体内に戻した際には、自然免疫系の経路からNK細胞を活性化させ、樹状細胞を刺激することにより間接的にヘルパーT細胞、キラーT細胞、B細胞を活性化することが期待できる。特異的ながんのみへの対応ではなく全体的な免疫力を向上させるために、がん発症により弱った受益者ががん以外の疾病へ罹患することを予防し、罹患しても軽く済んだり回復が早く済んだりすることも期待できる。がん治療以外にも、免疫力向上によるがん予防や、他の疾病予防に有効である。さらに本樹状細胞製剤は、受益者自身の細胞を基に培養した製剤であり、受益者専用であるため、拒絶反応はなく非常に安全性の高い製剤である。

[0068] <実施形態2：概要>主に請求項2

本実施形態2では、実施形態1の樹状細胞製剤の製造方法を基礎として、
(4)パルス工程は、(3)の分化工程にて所定の因子加えた日を0日とし

て、3日乃至は4日目に行う。

[0069] <実施形態2：(4)パルス工程： α -ガラクトシルセラミドのパルス>

実施形態1での α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングよりも本実施形態2では早く、分化工程で所定の因子としてGM-CSFとIL-4を添加した日を0日とした時の3日目又は4日目のいずれかに、未成熟樹状細胞が優勢な培養容器中の液体培地へ α -ガラクトシルセラミドをパルスする。 α -ガラクトシルセラミドは、実施形態1と同様に協和キリン株式会社の型名KRN7000を使用した。

[0070] <実施形態2：(4)パルス工程：最適なパルスタイミング>

本願発明の製造方法により製造した樹状細胞製剤は、 $V\alpha 24-NKT$ 細胞を刺激して活性化することで、IFN- γ などのサイトカインを産生させ、免疫系の様々な担い手を活性化することを期待される。製剤の効能の判断として、本願発明の製剤に対し製造方法の(2)非接着細胞除去工程にて除去し、別途培養保存しておいた非接着細胞（リンパ球（T細胞、B細胞、NK細胞、NKT細胞）など）を製剤完成後に加えて共培養を行い、リンパ球総数に対するIFN- γ を産生するNKT細胞数の比率を調査する。パルスタイミングと、前記共培養後のNKT細胞数比率の関係を調査し、最適なパルスタイミングを求める。前記のパルスタイミングはそのようにして決定した。なお、非接着細胞を利用するのは、受益者に身体的負荷をかけないためであってそれ以外の意図はない。従って新たに受益者から末梢血を採血して、採血した末梢血に対して本願発明の製造方法によって製造された樹状細胞製剤を加えて同じ様に効果の比較確認を行ってもよい。また、共培養を行ってNKT細胞の全リンパ球に対して占める割合の増加具合の違いを観察したが、この観察から判明したことは、本願発明の樹状細胞製剤によってNKT細胞の増殖率（自己分裂増殖と考えられる）が左右されるということである。従って、本願請求項1に記載の(5)のステップは、単に請求項上「NKT刺激樹状細胞誘導工程」とのみ記載しているが、別言すれば、「NKT増殖刺激樹状細胞誘導工程」とも言えるものである。

- [0071] 本実施形態では、単球から未成熟樹状細胞へ分化させるために所定の因子（例：GM-CSFとIL-4）を添加した日を0日として、以下日単位で時間表記している。製剤完成後に製剤の効果確認のため、非接着細胞を加え共培養をおこなった。最適なパルスタイミング検証のため、採血した単球を三分割し、 α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングが異なる樹状細胞製剤のサンプルを3つ準備した。それぞれ所定の因子添加後2日目（48時間後）に α -ガラクトシルセラミド（濃度100 ng/mL）をパルスしたもの（条件1）、4日目（96時間後）にパルスしたもの（条件2）、5日目（120時間後）にパルスしたもの（条件3）を作成した。
- [0072] 本製剤の効果確認のため、単球を未成熟樹状細胞に導くための所定の因子添加日を0日とした6日目に非接着細胞を加え共培養を開始する。共培養開始日（共培養開始から0日）当日、共培養開始日から7日目、共培養開始日から14日目の3回、リンパ球数に対するNK細胞数を調査した。
- [0073] 図1は上記の α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミング条件（条件1～3）と、IFN- γ を産生するNK細胞（非接着細胞に含まれていたもの）が共培養後のそれぞれのタイミングにおける全リンパ球数に対する比率の調査結果を示した図である。これはフローサイトメーターを利用して調査した結果である。3条件とも、共培養開始後7日目に、リンパ球数に対するNK細胞数の比率が最大となった。また3条件中では単球から未成熟樹状細胞へ分化させるために所定の因子を添加した日を0日とした4日目にパルスした場合に、共培養後のNK細胞数比率（%）が最大となった。最大となった共培養後7日目のNK細胞数比率（%）と、所定の因子添加日を0日としたパルスタイミング（日）との関係を図2aの散布図に示す。図2aには二次式で近似した場合の近似曲線を前後にも補外して記載している。この近似曲線の決定係数は1であり、十分に参考となると考えられる。曲線のピークはパルスタイミング3日目と4日目の間にある（近似式から算出すると3.7日）。好ましい範囲はピーク値の-10%までとなる、およそ2.5日目から5日目である。樹状細胞の寿命は数日から1週間程度である。

め、あまり本製造方法での製造（単球採血から又は、単球を未成熟樹状細胞に分化させるための所定因子添加から成熟樹状細胞に成熟させるまで、即ち成熟樹状細胞に誘導するための：GM-CSFとIL-4とOK-432とPGE2：を添加するまでの期間、（なお、この後完全に成熟するまでの時間長は10時間から20時間程度であるのでその時間長分の工程を含めてもよい。）の工程を言う。本実験では α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングは条件1から条件3で異なるが、GM-CSFとIL-4とOK-432とPGE2を添加するタイミングは一斉同時である）に長期間要すると製剤としての使用できる期間が短くなる。そのため培養開始から1週間以内に製剤を完成させることも考慮すると、より好ましくはピーク値の-5%までとなる範囲でもある3日目から4.5日目の間であり、3日目か4日目にパルスするのがよい。最も好ましいのは4日目にパルスを行うことである。

[0074] α -ガラクトシルセラミドを成熟前の樹状細胞にパルスする場合、単球から未成熟樹状細胞への分化の為に所定の因子（例：GM-CSFとIL-4）を添加した後、4日目または3日目のいずれかにパルスすることにより、製造された製剤は受益者体内で効果を最大に発揮できる。

[0075] <実施形態3：概要>主に請求項3

本実施形態3では、実施形態1の樹状細胞製剤の製造方法を基礎として、（4）パルス工程は、（3）の分化工程にて所定の因子を加えてから60時間後から108時間後までに行う。

[0076] <実施形態3：（4）パルス工程： α -ガラクトシルセラミドのパルス>

実施形態1での α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングよりも本実施形態3では早く、分化工程で所定の因子としてGM-CSFとIL-4添加した時点から60時間後から108時間後までに、 α -ガラクトシルセラミドをパルスする。 α -ガラクトシルセラミドは、実施形態1と同様に協和キリン株式会社の型名KRN7000を使用した。

[0077] <実施形態3：（4）パルス工程：最適なパルスタイミング>

本願発明の製造方法により製造した樹状細胞製剤は、 $V\alpha 24$ -NK細胞

を刺激して活性化することで、 $IFN-\gamma$ などのサイトカインを産生させ、免疫系の様々な担い手を活性化することを期待される。製剤の効能の判断として、本願発明の製剤に対し製造方法の(2)非接着細胞除去工程にて除去した非接着細胞(リンパ球(T細胞、B細胞、NK細胞)など)を製剤完成後に加えて共培養を行い、 $IFN-\gamma$ を産生するNK T細胞数の比率を調査する。パルスタイミングと、前記共培養後のNK T細胞数比率の関係を調査し、最適なパルスタイミングを前記実施形態2と同様に求める。前記のパルスタイミングはそうにして決定した。なお、非接着細胞を利用するのは、受益者に身体的負荷をかけないためであってそれ以外の意図はない。従って新たに受益者から末梢血を採血して、採血した末梢血に対して本願発明の製造方法によって製造された樹状細胞製剤を加えて同じ様に効果の比較確認を行ってもよい。また、共培養を行ってNK T細胞の全リンパ球に対して占める割合の増加具合の違いを観察したが、この観察から判明したことは、本願発明の樹状細胞製剤によってNK T細胞の増殖率(自己分裂増殖と考えられる)が左右されるということである。従って、本願請求項1に記載の(5)のステップは、単に請求項上「NK T刺激樹状細胞誘導工程」とのみ記載しているが、別言すれば、「NK T増殖刺激樹状細胞誘導工程」とも言えるものである。

[0078] 本実施形態では、単球から未成熟樹状細胞へ分化させるために所定の因子(例:GM-CSFとIL-4)を添加した時を0時間として、以下時間単位で時間表記している。製剤完成後に、製剤の効果確認のため、非接着細胞を加え共培養を行った。最適なパルスタイミング検証のため、実施形態1の製造方法に基づいた製造方法を用いて、採血した単球を三分割し α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングのみが異なる樹状細胞製剤のサンプルを3種類準備した。それぞれ所定の因子添加後48時間後(2日目)に α -ガラクトシルセラミド(濃度100ng/mL)をパルスしたもの(条件1)、96時間後(4日目)にパルスしたもの(条件2)、120時間後(5日目)にパルスしたもの(条件3)を作成した。

- [0079] 本製剤の効果確認のため、単球を未成熟樹状細胞に導くための所定の因子添加から144時間後（6日目）に非接着細胞を加え共培養を開始した。共培養開始日（共培養開始から0日）当日、共培養開始から7日目、共培養開始から14日目の3回、リンパ球数に対するNK細胞数比率を調査した。
- [0080] 図1は上記の α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミング条件（条件1～3）と、IFN- γ を産生するNK細胞（非接着細胞に含まれていたもの）が共培養後のそれぞれのタイミングにおける全リンパ球数に対する比率の調査結果を示した図である。これはフローサイトメーターを利用して調査した結果である。3条件とも、共培養開始後7日目に、リンパ球数に対するNK細胞数の比率が最大となった。また3条件中では単球から未成熟樹状細胞へ分化させるために所定の因子添加から96時間後（4日目）にパルスした場合にNK細胞数比率（%）が最大となった。最大となった共培養後7日目のNK細胞数比率（%）と、パルスタイミングとの関係を図2bの散布図に示す。図2bには二次式で近似した場合の近似曲線を前後にも補外して記載している。この近似曲線の決定係数は1であり、十分に参考となると考えられる。曲線のピークはパルスタイミング70時間後と96時間後の間にある（近似式から計算すると90h）。
- [0081] 好ましい範囲はピーク値の-10%までとなる、およそ60時間後から118時間後までである。樹状細胞の寿命は数日から1週間（168hまで）程度であるため、あまり本製造方法での製造（単球採血から又は、単球を未成熟樹状細胞に分化させるための所定因子添加から成熟樹状細胞に成熟させるまで、即ち成熟樹状細胞に誘導するための：GM-CSFとIL-4とOK-432とPGE2：を添加するまでの期間、（なお、この後完全に成熟するまでの時間長は10時間から20時間程度であるのでその時間長分の工程を含めてもよい。）の工程を言う。本実験では α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングは条件1から条件3で異なるが、GM-CSFとIL-4とOK-432とPGE2を添加するタイミングは一斉同時である）に長期間かかると製剤としての使用期間が短くなる。そのため培養開始から1

週間以内に製剤を完成させることも考慮すると、60時間後から108時間後までにパルスすることが好ましい。より好ましくはピーク値の-5%となる範囲である70時間後から108時間後までにパルスすることである。

[0082] α -ガラクトシルセラミドを成熟前の樹状細胞にパルスする場合、単球から未成熟樹状細胞への分化の為に所定の因子（例：GM-CSFとIL-4）を添加した後、60時間後から108時間後までにパルスすることにより、製造された製剤は受益者体内で効果を最大に発揮できる。

[0083] <実施形態4：概要>主に請求項4

本実施形態4では、実施形態1の樹状細胞製剤の製造方法を基礎として、（4）パルス工程は、（1）の接着工程にて受益者から採取された単球を培養容器に入れた日を0日として、4日目乃至は5日目までに行う。

[0084] <実施形態4：（4）パルス工程： α -ガラクトシルセラミドのパルス>

実施形態1での α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングよりも本実施形態4では早く、受益者から採取された単球を培養容器に入れた日を0日として、4日目乃至は5日目までに、 α -ガラクトシルセラミドをパルスする。 α -ガラクトシルセラミドは、実施形態1同様に協和キリン株式会社の型名KRN7000を使用した。

[0085] <実施形態4：（4）パルス工程：最適なパルスタイミング>

本願発明の製造方法により製造した樹状細胞製剤は、 $V\alpha 24$ -NK T細胞を刺激して活性化し、IFN- γ を産生し、免疫系の様々な担い手を活性化することを期待される。製剤の効能の判断として、本願発明の製剤に対し製造方法の（2）非接着細胞除去工程にて除去した非接着細胞（リンパ球（T細胞、B細胞、NK細胞）など）を製剤完成後に加えて共培養を行い、IFN- γ を産生するNK T細胞数の比率を調査する。パルスタイミングと、前記共培養後のNK T細胞数比率の関係を調査し、最適なパルスタイミングを求める。前記のパルスタイミングはそうにして決定した。なお、非接着細胞を利用するのは、受益者に身体的負荷をかけないためであってそれ以外の意図はない。従って新たに受益者から末梢血を採血して、採血した末梢血

に対して本願発明の製造方法によって製造された樹状細胞製剤を加えて同じ様に効果の比較確認を行ってもよい。また、共培養を行ってNK T細胞の全リンパ球に対して占める割合の増加具合の違いを観察したが、この観察から判明したことは、本願発明の樹状細胞製剤によってNK T細胞の増殖率（自己分裂増殖と考えられる）が左右されるということである。従って、本願請求項1に記載の（5）のステップは、単に請求項上「NK T刺激樹状細胞誘導工程」とのみ記載しているが、別言すれば、「NK T増殖刺激樹状細胞誘導工程」とも言えるものである。

[0086] 本実施形態では、受益者から採取された単球を培養容器に入れ培養開始した時を起点として、以下日単位で時間表記している。製剤完成後、製剤の効果確認のため、非接着細胞を加え共培養を行った。最適なパルスタイミング検証のため、実施形態1の製造方法に基づいた製造方法を用いて、採血した単球を三分割し α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングのみが異なる樹状細胞製剤のサンプルを3種類準備した。それぞれ受益者から採取された単球を培養容器に入れたときから3日後（72時間後）に α -ガラクトシルセラミド（濃度100 ng/mL）をパルスしたもの（条件1）、5日後（120時間後）にパルスしたもの（条件2）、6日後（144時間後）にパルスしたもの（条件3）を作成した。なおこの実験では、受益者から採取された単球を培養容器に入れた24時間後に単球を未成熟樹状細胞へと分化させるための所定の因子としてGM-CSFとIL-4を添加した。

[0087] 本製剤の効果確認のため、受益者から採取された単球を培養容器に入れた日を0日として、7日目に非接着細胞を加え共培養を開始する。共培養開始日（共培養開始から0日）、共培養開始から7日目、共培養開始から14日目の3回、リンパ球数に対するNK T細胞数比率を調査した。

[0088] 図3は上記の α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミング条件（条件1～3）と、IFN- γ を産生するNK T細胞（非接着細胞に含まれていたもの）が共培養後のそれぞれのタイミングにおける全リンパ球数に対する比率の調査結果を示した図である。これはフローサイトメーターを利用して調査

した結果である。3条件とも、共培養開始後7日目に、リンパ球数に対するNK T細胞数の比率が最大となった。また3条件中では培養開始後5日目にパルスした場合にNK T細胞数比率(%)が最大となった。最大となった共培養後7日目のNK T細胞数比率(%)と、パルスタイミングとの関係を図4 aの散布図に示す。図4 aには二次式で近似した場合の近似曲線を前後にも補外して記載している。この近似曲線の決定係数は1であり、十分に参考となると考えられる。曲線のピークは培養開始を0日として、4日目と5日目の間にある(近似式から計算すると4.7日)。好ましい範囲はピーク値の-10%までとなる、およそ3.5日目から6日目である。樹状細胞の寿命は数日から1週間程度であるため、あまり本製造方法での製造(単球採血から又は、単球を未成熟樹状細胞に分化させるための所定因子添加から成熟樹状細胞に成熟させるまで、即ち成熟樹状細胞に誘導するための: GM-CSFとIL-4とOK-432とPGE2:を添加するまでの期間、(なお、この後完全に成熟するまでの時間長は10時間から20時間程度であるのでその時間長分の工程を含めてもよい。)の工程を言う。本実験では α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングは条件1から条件3で異なるが、GM-CSFとIL-4とOK-432とPGE2を添加するタイミングは一斉同時である)に長期間かかると製剤としての使用期間が短くなる。そのため培養開始から1週間以内に製剤を完成させることも考慮すると、好ましくはピークの-5%となる範囲でもある3.9日目から5.5日目の間である。最も好ましいのは5日目にパルスを行うことである。

[0089] α -ガラクトシルセラミドを成熟前の樹状細胞にパルスする場合、受益者から採取された単球を培養容器に入れた日を0日として、4日目または5日目にパルスすることにより、製造された製剤は受益者体内で効果を最大に発揮できる。

[0090] <実施形態5: 概要>主に請求項5

本実施形態5では、実施形態1の樹状細胞製剤の製造方法を基礎として、
(4) パルス工程は、(1)の接着工程にて受益者から採取された単核球を

培養容器に入れてから84時間後乃至は132時間後に行う。

[0091] <実施形態5：(4)パルス工程： α -ガラクトシルセラミドのパルス>

実施形態1での α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングよりも本実施形態5では早く、受益者から採取された単球を培養容器に入れた時から84時間後乃至は132時間後の間に、 α -ガラクトシルセラミドをパルスする。 α -ガラクトシルセラミドは、実施形態1同様に協和キリン株式会社の型名KRN7000を使用した。

[0092] <実施形態5：(4)パルス工程：最適なパルスタイミング>

本願発明の製造方法により製造した樹状細胞製剤は、 $V\alpha 24-NK T$ 細胞を刺激して活性化し、 $IFN-\gamma$ を産生し、免疫系の様々な担い手を活性化することを期待される。製剤の効能の判断として、本願発明の製剤に対し製造方法の(2)非接着細胞除去工程にて除去した非接着細胞(リンパ球(T 細胞、 B 細胞、 NK 細胞)など)を製剤完成後に加えて共培養を行い、 $IFN-\gamma$ を産生する $NK T$ 細胞数の比率を調査する。前記実施形態4と同様にパルスタイミングと、前記共培養後の $NK T$ 細胞数比率の関係を調査し、最適なパルスタイミングを求める。前記のパルスタイミングはそうようにして決定した。なお、非接着細胞を利用するのは、受益者に身体的負荷をかけないためであってそれ以外の意図はない。従って新たに受益者から末梢血を採血して、採血した末梢血に対して本願発明の製造方法によって製造された樹状細胞製剤を加えて同じ様に効果の比較確認を行ってもよい。また、共培養を行って $NK T$ 細胞の全リンパ球に対して占める割合の増加具合の違いを観察したが、この観察から判明したことは、本願発明の樹状細胞製剤によって $NK T$ 細胞の増殖率(自己分裂増殖と考えられる)が左右されるということである。従って、本願請求項1に記載の(5)のステップは、単に請求項上「 $NK T$ 刺激樹状細胞誘導工程」とのみ記載しているが、別言すれば、「 $NK T$ 増殖刺激樹状細胞誘導工程」とも言えるものである。

[0093] 本実施形態では、受益者から採取された単球を培養容器に入れ培養開始した時を起点として、以下時間で時間表記している。製剤完成後、製剤の効果

確認のため非接着細胞を加え共培養を行った。最適なパルスタイミングを検証するため、実施形態1の製造方法に基づいた製造方法を用いて、採血した単球を三分割し α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングのみが異なる樹状細胞製剤のサンプルを3種類準備した。それぞれ受益者から採取された単球を培養容器に入れたとき（培養開始）から72時間後（3日後）に α -ガラクトシルセラミド（濃度100 ng/mL）をパルスしたもの（条件1）、120時間後（5日後）にパルスしたもの（条件2）、144時間後（6日後）にパルスしたもの（条件3）を作成する。なおこの実験では、受益者から採取された単球を培養容器に入れた24時間後に単球を未成熟樹状細胞へと分化させるための所定の因子としてGM-CSFとIL-4を添加した。

[0094] 本製剤の効果確認のため、受益者から採取された単核球を培養容器に入れた時から168時間後に非接着細胞を加え共培養を開始する。共培養開始日（共培養開始から0日）、共培養開始から7日目、共培養開始から14日目の3回、リンパ球数に対するNK T細胞数比率を調査した。

[0095] 図3は上記の α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミング条件（条件1～3）と、IFN- γ を産生するNK T細胞（非接着細胞に含まれていたもの）が共培養後の夫々のタイミングにおける全リンパ球数に対する比率の調査結果を示した図である。これはフローサイトメーターを利用して調査した結果である。3条件とも、共培養開始後7日目に、リンパ球数に対するNK T細胞数の比率が最大となった。また3条件中ではこれはフローサイトメーターを利用して調査した結果である。培養開始後5日目にパルスした場合に、共培養開始後7日目のNK T細胞数比率（%）が最大となった。最大となった共培養後7日目のNK T細胞数比率（%）と、パルスタイミングとの関係を図4bの散布図に示す。図4bには二次式で近似した場合の近似曲線を前後にも補外し記載している。この近似曲線の決定係数は1であり、十分に参考となると考えられる。曲線のピークは96時間後（培養開始を0日とした4日目）と120時間後（培養開始を0日とした5日目）の間（約114

時間後)にある。好ましい範囲はピーク値の-10%までとなる、おおよそ84時間後から143時間後である。樹状細胞の寿命は数日から1週間(168時間)程度であるため、あまり本製造方法での製造(単球採血から又は、単球を未成熟樹状細胞に分化させるための所定因子添加から成熟樹状細胞に成熟させるまで、即ち成熟樹状細胞に誘導するための:GM-CSFとIL-4とOK-432とPGE2:を添加するまでの期間、(なお、この後完全に成熟するまでの時間長は10時間から20時間程度であるのでその時間長分の工程を含めてもよい。)の工程を言う。本実験では α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングは条件1から条件3で異なるが、GM-CSFとIL-4とOK-432とPGE2を添加するタイミングは一斉同時である)に長期間かかると製剤としての使用期間が短くなる。そのため培養開始から1週間以内に製剤を完成させるために、84時間後から132時間後までにパルスすることが好ましい。より好ましくはピークの-5%となる範囲でもある94時間後から132時間後までにパルスを行うことである。

[0096] α -ガラクトシルセラミドを成熟前の樹状細胞にパルスする場合、受益者から採取された単球を培養容器に入れてから84時間後から132時間後までにパルスすることにより、製造された製剤は受益者体内で効果を最大に発揮できる。

[0097] <実施形態6:概要>主に請求項6

本実施形態6では、実施形態1の樹状細胞製剤の製造方法を基礎として、(4)パルス工程は、(2)の非接着細胞除去工程にて培養容器の内面に接着した細胞以外の単球を含む非接着細胞を除去した日を0日として、4日目乃至は5日目に行う。

[0098] <実施形態6:(4)パルス工程: α -ガラクトシルセラミドのパルス>

実施形態1での α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングよりも本実施形態6では早く、(2)の非接着細胞除去工程にて培養容器の内面に接着した細胞以外の単球を含む非接着細胞を除去した日を0日として、4日目乃至は5日目までに、 α -ガラクトシルセラミドをパルスする。 α -ガラクトシ

ルセラミドは、実施形態1同様に協和キリン株式会社の型名K R N 7 0 0 0を使用した。

[0099] <実施形態6：（4）パルス工程：最適なパルスタイミング>

本願発明の製造方法により製造した樹状細胞製剤は、 $V\alpha 24-NK T$ 細胞を刺激して活性化し、 $IFN-\gamma$ を産生し、免疫系の様々な担手を活性化することを期待される。製剤の効能の判断として、本願発明の製剤に対し製造方法の（2）非接着細胞除去工程にて除去した非接着細胞（リンパ球（T細胞、B細胞、NK細胞）など）を製剤完成後に加えて共培養を行い、 $IFN-\gamma$ を産生するNK T細胞数の比率を調査する。パルスタイミングと、前記共培養後のNK T細胞数比率の関係を調査し、最適なパルスタイミングを求める。前記のパルスタイミングはそうにして決定した。なお、非接着細胞を利用するのは、受益者に身体的負荷をかけないためであってそれ以外の意図はない。従って新たに受益者から末梢血を採血して、採血した末梢血に対して本願発明の製造方法によって製造された樹状細胞製剤を加えて同じ様に効果の比較確認を行ってもよい。また、共培養を行ってNK T細胞の全リンパ球に対して占める割合の増加具合の違いを観察したが、この観察から判明したことは、本願発明の樹状細胞製剤によってNK T細胞の増殖率（自己分裂増殖と考えられる）が左右されるということである。従って、本願請求項1に記載の（5）のステップは、単に請求項上「NK T刺激樹状細胞誘導工程」とのみ記載しているが、別言すれば、「NK T増殖刺激樹状細胞誘導工程」とも言えるものである。

[0100] 本実施形態では、（2）の非接着細胞除去工程にて培養容器の内面に接着した細胞以外の単球を含む非接着細胞を除去した時を起点として、以下日単位で時間表記している。製剤完成後、製剤の効果確認のため、非接着細胞を加え共培養を行った。最適なパルスタイミング検証のため、実施形態1の製造方法に基づいた製造方法を用いて、採血した単球を三分割し α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングのみが異なる樹状細胞製剤のサンプルを3種類準備した。それぞれ（2）の非接着細胞除去工程にて培養容器の内面に

接着した細胞以外の単球を含む非接着細胞を除去した時から3日後（72時間後）に α -ガラクトシルセラミド（濃度100 ng/mL）をパルスしたもの（条件1）、5日後（120時間後）にパルスしたもの（条件2）、6日後（144時間後）にパルスしたもの（条件3）を作成した。なおこの実験では、（2）の非接着細胞除去工程にて培養容器の内面に接着した細胞以外の単球を含む非接着細胞を除去した24時間後に単球を未成熟樹状細胞へと分化させるための所定の因子としてGM-CSFとIL-4を添加した。

[0101] 本製剤の効果確認のため、（2）の非接着細胞除去工程にて培養容器の内面に接着した細胞以外の単球を含む非接着細胞を除去した日を0日として、7日目に非接着細胞を加え共培養を開始する。共培養開始日（共培養開始から0日）、共培養開始から7日目、共培養開始から14日目の3回、リンパ球数に対するNK細胞数比率を調査した。

[0102] 図3は上記の α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミング条件（条件1～3）と、IFN- γ を産生するNK細胞（非接着細胞に含まれていたもの）が共培養後のそれぞれのタイミングにおける全リンパ球数に対する比率の調査結果を示した図である。図3右横の条件の「培養開始してから」を、「（2）の非接着細胞除去工程にて培養容器の内面に接着した細胞以外の単球を含む非接着細胞を除去してから」に読み替える。図3はフローサイトメーターを利用して調査した結果である。3条件とも、共培養開始後7日目に、リンパ球数に対するNK細胞数の比率が最大となった。また3条件中では非接着細胞除去後5日目にパルスした場合にNK細胞数比率（%）が最大となった。最大となった共培養後7日目のNK細胞数比率（%）と、パルスタイミングとの関係を図4aの散布図に示す。図4aには二次式で近似した場合の近似曲線を前後にも補外して記載している。この近似曲線の決定係数は1であり、十分に参考となると考えられる。曲線のピークは非接着細胞を除去した日を0日として、4日目と5日目の間にある（近似式から計算すると4.7日）。好ましい範囲はピーク値の-10%までとなる、およそ3.5日目から6日目である。樹状細胞の寿命は数日から1週間程度であ

るため、あまり本製造方法での製造（単球採血から又は、単球を未成熟樹状細胞に分化させるための所定因子添加から成熟樹状細胞に成熟させるまで、即ち成熟樹状細胞に誘導するための：GM-CSFとIL-4とOK-432とPGE2：を添加するまでの期間、（なお、この後完全に成熟するまでの時間長は10時間から20時間程度であるのでその時間長分の工程を含めてもよい。）の工程を言う。本実験では α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングは条件1から条件3で異なるが、GM-CSFとIL-4とOK-432とPGE2を添加するタイミングは一斉同時である）に長期間かかると製剤としての使用期間が短くなる。そのため非接着細胞除去から1週間以内に製剤を完成させることも考慮すると、好ましくはピークの-5%となる範囲でもある3.9日目から5.5日目の間である。最も好ましいのは5日目にパルスを行うことである。

[0103] α -ガラクトシルセラミドを成熟前の樹状細胞にパルスする場合、（2）の非接着細胞除去工程にて培養容器の内面に接着した細胞以外の単球を含む非接着細胞を除去した日として、4日目または5日目にパルスすることにより、製造された製剤は受益者体内で効果を最大に発揮できる。

[0104] <実施形態7：概要>主に請求項7

本実施形態7では、実施形態1の樹状細胞製剤の製造方法を基礎として、（4）パルス工程は、（2）の非接着細胞除去工程にて培養容器の内面に接着した細胞以外の単球を含む非接着細胞を除去してから84時間後から132時間後までに行う。

[0105] <実施形態7：（4）パルス工程： α -ガラクトシルセラミドのパルス>

実施形態1での α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングよりも本実施形態7では早く、（2）の非接着細胞除去工程にて培養容器の内面に接着した細胞以外の単球を含む非接着細胞を除去してから84時間後から132時間後までの間に、 α -ガラクトシルセラミドをパルスする。 α -ガラクトシルセラミドは、実施形態1同様に協和キリン株式会社の型名KR N7000を使用した。

[0106] <実施形態7：(4)パルス工程：最適なパルスタイミング>

本願発明の製造方法により製造した樹状細胞製剤は、 $V\alpha 24-NK T$ 細胞を刺激して活性化し、 $IFN-\gamma$ を産生し、免疫系の様々な担い手を活性化することを期待される。製剤の効能の判断として、本願発明の製剤に対し製造方法の(2)非接着細胞除去工程にて除去した非接着細胞(リンパ球(T 細胞、 B 細胞、 NK 細胞)など)を製剤完成後に加えて共培養を行い、 $IFN-\gamma$ を産生する $NK T$ 細胞数の比率を調査する。前記実施形態6と同様にパルスタイミングと、前記共培養後の $NK T$ 細胞数比率の関係を調査し、最適なパルスタイミングを求める。前記のパルスタイミングはそうようにして決定した。なお、非接着細胞を利用するのは、受益者に身体的負荷をかけないためであってそれ以外の意図はない。従って新たに受益者から末梢血を採血して、採血した末梢血に対して本願発明の製造方法によって製造された樹状細胞製剤を加えて同じ様に効果の比較確認を行ってもよい。また、共培養を行って $NK T$ 細胞の全リンパ球に対して占める割合の増加具合の違いを観察したが、この観察から判明したことは、本願発明の樹状細胞製剤によって $NK T$ 細胞の増殖率(自己分裂増殖と考えられる)が左右されるということである。従って、本願請求項1に記載の(5)のステップは、単に請求項上「 $NK T$ 刺激樹状細胞誘導工程」とのみ記載しているが、別言すれば、「 $NK T$ 増殖刺激樹状細胞誘導工程」とも言えるものである。

[0107] 本実施形態では、(2)の非接着細胞除去工程にて培養容器の内面に接着した細胞以外の単球を含む非接着細胞を除去した時を起点として、以下時間で時間表記している。製剤完成後、製剤の効果確認のため非接着細胞を加え共培養を行った。最適なパルスタイミングを検証するため、実施形態1の製造方法に基づいた製造方法を用いて、採血した単球を三分割し α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングのみが異なる樹状細胞製剤のサンプルを3種類準備した。それぞれ非接着細胞を除去した時から72時間後(3日後)に α -ガラクトシルセラミド(濃度100 ng/mL)をパルスしたもの(条件1)、120時間後(5日後)にパルスしたもの(条件2)、144時

間後（6日後）にパルスしたもの（条件3）を作成する。なおこの実験では、非接着細胞を除去した24時間後に単球を未成熟樹状細胞へと分化させるための所定の因子としてGM-CSFとIL-4を添加した。

[0108] 本製剤の効果確認のため、非接着細胞を除去した時から168時間後に非接着細胞を加え共培養を開始する。共培養開始日（共培養開始から0日）、共培養開始から7日目、共培養開始から14日目の3回、リンパ球数に対するNK細胞数比率を調査した。

[0109] 図3は上記の α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミング条件（条件1～3）と、IFN- γ を産生するNK細胞（非接着細胞に含まれていたもの）が共培養後の夫々のタイミングにおける全リンパ球数に対する比率の調査結果を示した図である。図3右横の条件の「培養開始してから」を、「（2）の非接着細胞除去工程にて培養容器の内面に接着した細胞以外の単球を含む非接着細胞を除去してから」に読み替える。図3はフローサイトメーターを利用して調査した結果である。3条件とも、共培養開始後7日目に、リンパ球数に対するNK細胞数の比率が最大となった。また3条件中ではこれはフローサイトメーターを利用して調査した結果である。非接着細胞除去後5日目にパルスした場合に、共培養開始後7日目のNK細胞数比率（%）が最大となった。最大となった共培養後7日目のNK細胞数比率（%）と、パルスタイミングとの関係を図4bの散布図に示す。図4bには二次式で近似した場合の近似曲線を前後にも補外し記載している。この近似曲線の決定係数は1であり、十分に参考となると考えられる。曲線のピークは96時間後（非接着細胞除去した日を0日とした4日目）と120時間後（非接着細胞除去した日を0日とした5日目）の間（約114時間後）にある。好ましい範囲はピーク値の-10%までとなる、およそ84時間後から143時間後である。樹状細胞の寿命は数日から1週間（168時間）程度であるため、あまり本製造方法での製造（単球採血から又は、単球を未成熟樹状細胞に分化させるための所定因子添加から成熟樹状細胞に成熟させるまで、即ち成熟樹状細胞に誘導するための：GM-CSFとIL-4とOK-43

2とPGE2：を添加するまでの期間、（なお、この後完全に成熟するまでの時間長は10時間から20時間程度であるのでその時間長分の工程を含めてもよい。）の工程を言う。本実験では α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングは条件1から条件3で異なるが、GM-CSFとIL-4とOK-432とPGE2を添加するタイミングは一斉同時である）に長期間かかると製剤としての使用期間が短くなる。そのため培養開始から1週間以内に製剤を完成させるために、84時間後から132時間後までにパルスすることが好ましい。より好ましくはピークの5%となる範囲でもある94時間後から132時間後までにパルスを行うことである。

[0110] α -ガラクトシルセラミドを成熟前の樹状細胞にパルスする場合、非接着細胞を除去してから84時間後から132時間後までにパルスすることにより、製造された製剤は受益者体内で効果を最大に発揮できる。

[0111] <実施形態8：概要>主に請求項8

未成熟樹状細胞へ、 $V\alpha 24$ -NK細胞を刺激する樹状細胞であるNK細胞を誘導するためにパルスする、 α -ガラクトシルセラミドの濃度を300 ng/mL～1000 ng/mLとする。以下本実施形態では、受益者から採取された単球を培養容器に入れた日を0日として α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングを記載する。本実施形態では α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングは実施形態5を元に培養開始から120時間後とする。なおパルスタイミングは培養開始から84時間後～132時間後の間でもよいし、実施形態4で説明したように単核球を培養容器に入れて培養開始した日を0日として4日後ないしは5日後にパルスしてもよい。または実施形態2、3で説明したように分化工程において所定の因子を添加した日を0日として3日乃至は4日目にパルスするか、所定の因子を加えてから60時間後乃至は108時間後までにパルスしてもよい。または前記実施形態6、7のように、非接着細胞を培養容器から除去した日を0日として4日目乃至は5日目にパルスするか、非接着細胞を除去してから84時間後から132時間後の間にパルスしてもよい。

[0112] <実施形態8：（4）パルス工程：最適なパルス量>

本実施形態8では、前記実施形態5の製造方法に準じて製造するが、実施形態5との相違は、パルスする α -ガラクトシルセラミドの濃度を300 ng/mL～1000 ng/mLとする点である。本実施形態8では、受益者から採取された単球を培養容器に入れたタイミングである培養開始から120時間後に α -ガラクトシルセラミドをパルスした。

[0113] 本願発明の製造方法により製造した樹状細胞製剤は、V α 24-NK T細胞を刺激して活性化させてIFN- γ を産生することにより、免疫系の様々な担い手を活性化することを期待される。製剤の効能の判断として、本願発明の製剤に対し製造方法の（2）非接着細胞除去工程にて除去し、別途培養保存しておいた非接着細胞（リンパ球（T細胞、B細胞、NK細胞、NK T細胞）など）を製剤完成後に加えて共培養を行い、パルスする α -ガラクトシルセラミドの濃度と、共培養後に培養された非接着細胞中のNK T細胞からIFN- γ が産生された量（濃度）の関係を調査し、効果として確認する。前記のパルス量の範囲はそうようにして決定したものである。

[0114] 本実施形態では、受益者から採取された単球を培養容器に入れ培養開始した時を起点として、以下時間単位で時間表記している。製剤完成後、製剤の効果確認のため、非接着細胞を加え共培養を行った。最適なパルス濃度を検証するため、採血した単球を4分割し、 α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングが異なる樹状細胞製剤のサンプルを4つ準備した。受益者から採取された単球を培養容器に入れ培養開始したときから120時間後に、それぞれ、条件1：濃度0 ng/mL、条件2：100 ng/mL、条件3：300 ng/mL、条件4：1000 ng/mLの α -ガラクトシルセラミドをパルスした。

本製剤の効果確認（IFN- γ 産生濃度評価）のため、培養開始した時から168時間後に、非接着細胞を加え共培養を開始した。共培養開始した日を0日とした0日目（共培養開始した日）当日、2日目、4日目、7日目、14日目にそれぞれの条件の試料に対しIFN- γ 産生量を調査した。

[0115] IFN- γ の測定にはELISA法により、BIOLEGEND社のELISA MAX Deluxe Set Human IFN- γ を使用して行った。

[0116] 図5は、受益者から採取された単球を培養容器に入れ培養開始したときから120時間後にパルスした α -ガラクトシルセラミドの濃度と、非接着細胞と共培養開始してから0（当日）、2、4、7、14日目時点でのIFN- γ の濃度を測定した結果の関係を示す図である。横軸が共培養した日数、縦軸がIFN- γ 濃度（pg/mL）である。前記のように条件1～4ではパルスした α -ガラクトシルセラミドの濃度を0～1000 ng/mLで4段階に振って実験した。図5に示すように、条件1（0 ng/mL）と条件2（100 ng/mL）では共培養開始から7日目にIFN- γ の産生濃度のピークがある。条件3（300 ng/mL）と条件4（1000 ng/mL）は4日目に産生濃度のピークがありピーク値は条件2（100 ng/mL）と同等である。条件3（300 ng/mL）と条件4（1000 ng/mL）は、先行技術（特許文献1、以下同じ）で開示された実施形態1の濃度条件（100 ng/mL）と同じパルス濃度での産生濃度のピークが3日早まる結果となり、早く効を奏することが分かった。このようにパルスする α -ガラクトシルセラミドの濃度は300 ng/mL未満ではIFN- γ の産生ピークが遅くなり、1000 ng/mLを超える濃度をパルスしても1000 ng/mLと結果は同様であって α -ガラクトシルセラミドが無駄となる。そのため最適な α -ガラクトシルセラミドの濃度は300 ng/mL以上、1000 ng/mL以下であることが分かった。

また、後記する先行技術（特許文献1）との比較実験において、同濃度の α -ガラクトシルセラミドをパルスした場合、成熟樹状細胞に対してパルスする先行技術（特許文献1）に対し、未成熟樹状細胞に対してパルスする本願発明のほうが約4倍のIFN- γ 産生濃度を得ることができた。先行技術よりも多くのIFN- γ を作り出すことができ、免疫系をより活性化してより大きな抗がん作用を奏することが期待できる。

[0117] 本実施形態により、本製造方法の製剤は受益者体内において、 $\text{IFN-}\gamma$ の産生ピークを他条件と同等のピーク値のまま、早めることができ、より早く抗がん作用を奏することが期待できる。また先行技術よりも高い $\text{IFN-}\gamma$ 産生濃度が得られ、より大きな抗がん作用を奏することも期待できる。

[0118] <実施形態9：概要>主に請求項9、10

実施形態1から実施形態8で示した製造方法によって製造される樹状細胞製剤のいずれかーを加えた受益者の血液である。

[0119] 前記実施形態1において説明したように、受益者の血液に対して本製剤を加えると、NK細胞を刺激して自然免疫系を活性化（免疫力向上）することによって、獲得免疫系をも刺激して活性化させる効果がある。受益者の血液に対して免疫力向上の効果がある。

[0120] 受益者の血液を体外へ取り出し、本製剤を加えて加工してもよい。加工した血液（本製剤も含む）を受益者に戻入することで、受益者の免疫力向上が期待できる。または本製剤を受益者体内へ戻入させ、体内の血液に加えて免疫力向上を図ってもよい。なお、受益者の血液に、受益者に輸血可能な血液を加えたものである受益者の準血液によって上記受益者の血液を置き換えてもよい。

[0121] <人体への適用結果>

本願発明の実施形態4の条件（採血日に培養開始し非接着細胞を除去し、培養開始後24時間後に GM-CSF と IL-4 添加し、同5日目に α -ガラクトシルセラミドを 300 ng/mL パルス）で製造した樹状細胞製剤を、受益者2名へ投与した。本願発明の樹状細胞製剤が体内でどのように効を奏するかは上述している。NK細胞を活性化させ $\text{IFN-}\gamma$ の産生を通じて他の様々な免疫をつかさどる細胞を活性化する。特にNK細胞へは大きく影響を及ぼすため、効果投与後のNK活性値と $\text{IFN-}\gamma$ 量を調べた。その結果を図6に示す。2名の受益者へ投与し一人は皮下注射（表上段）、もう一人は点滴にて投与（表下段）した結果である。NK活性値はNK細胞が活性化したこと

を示す数値である。NK活性は投与後3日目以降増加し7日目もまだ投与前よりも高い数値である。IFN- γ の計測下限は0.1であり、通常は0.1以下である。IFN- γ の計測結果は初日(0日)0.1となっているが、投与後2日目にピークとなり、両人とも大きく数字が増えている。本樹状細胞製剤が目的としたNK T細胞を活性化しIFN- γ の産生量を早く増やし、NK細胞をも活性化させるということを達成したことを示す。

[0122] <先行技術との比較：概要>

先行技術では、明細書中ではIFN- γ の産生量(産生濃度)について記載されていない。そのため本願発明の発明者が、先行技術である特許文献1に記載の細胞組成物(本願の樹状細胞製剤に相当)の製造方法に倣って細胞組成物を試作し、NK T細胞を含む非接着細胞と共培養後のIFN- γ 生成濃度を比較する実験を行った。

[0123] <先行技術との比較：比較例作成>

先行技術の再現のため成分採血した単核球を、培養容器の液体培地内に2時間正置し、非接着細胞(リンパ球(T細胞、B細胞、NK細胞、NK T細胞)など)を分離し、凍結保存した。この正置し接着細胞の培養を開始した日を0日とする。翌日(1日目)、接着細胞の培養液にGM-CSFとIL-4を添加し、未成熟樹状細胞へ分化させた。5日目に、未成熟樹状細胞へGM-CSFとIL-4とPGE-2とOK-432とを添加し、未成熟樹状細胞を成熟化させた。翌6日目に、成熟樹状細胞へ α -ガラクトシルセラミド(濃度300 ng/mL)をパルスした。

[0124] <先行技術との比較：比較例の効果確認方法>

7日目に前記成熟樹状細胞と初日に回収した非接着細胞との共培養を開始した。共培養を開始した日(0日)、共培養開始した日を0日とした時の2、4、7、14日に非接着細胞中のNK T細胞が産生したIFN- γ 産生濃度(pg/mL)を測定した。

[0125] <先行技術との比較：比較例と本願実施形態との効果比較>

上記のように比較例として先行技術に倣って試作した(特許文献1記載の

製造方法に準拠、ただしパルスした α -ガラクトシルセラミドは濃度 300 ng/mL ）樹状細胞と非接着細胞との共培養後の $\text{IFN-}\gamma$ 産生濃度と、本願実施形態8の条件3（パルスした α -ガラクトシルセラミドは濃度 300 ng/mL ）で製造した樹状細胞製剤と非接着細胞との共培養後の $\text{IFN-}\gamma$ 産生濃度と、を比較した。なお、比較例と本願実施形態8の条件3で製造した製剤の効果確認のためには、有意な差が生じない範囲に細胞数差を抑えた同一受益者由来の樹状細胞とNK細胞を含む非接着性細胞を使用した。

[0126] <先行技術との比較：比較例と本願実施形態との効果比較： $\text{IFN-}\gamma$ 産生濃度>

図7に $\text{IFN-}\gamma$ 産生濃度比較結果を示す。横軸に共培養開始後の経過日数0日（開始初日）、2日、4日、7日、14日を示し、縦軸は $\text{IFN-}\gamma$ の産生濃度（ pg/mL ）を示す。比較例（先行技術）と本願実施形態8の条件3共に、4日目に $\text{IFN-}\gamma$ 産生濃度が大きくなる。先行技術では4日目より7日目の方が、若干産生濃度が大きい。本願実施形態8の条件3は、先行技術の約4倍大きい $\text{IFN-}\gamma$ 産生濃度を示す結果となった。

[0127] <先行技術との比較：比較例と本願実施形態との効果比較： $\text{IFN-}\gamma$ 産生ピーク>

先行技術である特許文献1で最も好ましい α -ガラクトシルセラミド濃度範囲は80から 120 ng/mL と記載されており、特許文献1の実施形態1では 100 ng/mL で実験されている。特許文献1では、 $\text{IFN-}\gamma$ の産生については効果検証されていない。本願発明者の実験中で特許文献1の実施形態1と同様の α -ガラクトシルセラミド濃度（ 100 ng/mL ）をパルスする本願実施形態8の条件2では、 $\text{IFN-}\gamma$ の産生ピークは共培養後7日目である。したがって特許文献1には記載ないものの、本願発明者は α -ガラクトシルセラミドのパルスタイミングだけではなくパルス濃度を最適化することにより、先行技術よりも早く効を奏することができる範囲を絞り込むことができることを見出した。

[0128] <先行技術との比較：本願発明の優れた効果>

比較例（先行技術）と比べ、本願発明では未成熟樹状細胞へ α -ガラクトシルセラミドをパルスすること、パルスするタイミングとその濃度を最適化することにより、早くIFN- γ を産生させることができる範囲を絞り込み、IFN- γ の産生濃度を著しく向上することができた。

[0129] <アメリカ出願用の治療方法を記載した請求項案>：（仮）

本願発明の製造方法で製造したNK T細胞を刺激する樹状細胞製剤を用いた、がん治療、がん予防、免疫力向上のいずれか一以上を希望する受益者に対する治療法については以下のように記載できる。

によって製造された製剤による治療方法であって、

（１）受益者から成分採血又は採血によって単球又は単球を含む末梢血を採取する採取ステップと、

（２）採取した単球を液体培地を用いた培養容器に入れ、静置して前記単球のうちの一部の細胞を容器の内面に接着させる接着ステップと、

（３）培養容器の内面に接着した細胞以外の単球を含む非接着細胞を除去する非接着細胞除去ステップと、

（４）前記培養容器に所定の因子を入れて、前記培養容器内面に接着した単球を未成熟樹状細胞に分化させる分化ステップと、

（５）前記未成熟樹状細胞が非接着状態で存在する培養容器に α -ガラクトシルセラミドをパルスするパルスステップと、

（６）未成熟樹状細胞から、NK T細胞を刺激する樹状細胞であるNK T刺激樹状細胞を誘導するNK T刺激樹状細胞誘導ステップと、

を含むことを特徴とする製造方法によって、がん治療、がん予防、免疫力向上のいずれか一以上を目的としたナチュラルキラーT（NK T）細胞を刺激する樹状細胞からなる樹状細胞製剤を製造し

（７）前記樹状細胞製剤を、前記単球を採取した受益者の体内に戻入する戻入ステップと、

を有するナチュラルキラーT（NK T）細胞を刺激する樹状細胞からなる樹

状細胞製剤を用いた治療方法。

[0130] (仮)

＜前記請求項案の限定条件案＞ (仮)

前記治療方法については、次のいずれか一以上の限定条件を付けることができる。

(a) パルスステップにおいて、 α -ガラクトシルセラミドをパルスするのは、接着ステップにて液体培地を用いた培養容器へ単球を入れたときから84時間から132時間後（単球を入れた時を0日として4日後ないしは5日後）である治療方法。

(b) パルスステップにおいて、パルスする α -ガラクトシルセラミドの濃度は300～1000 ng/mLである治療方法。

(c) 戻入ステップにおいて、前記製剤を受益者の体内へ戻入させるのは、接着ステップにて液体培地を用いた培養容器へ単球を入れたときから156時間後以降（単球を入れた時を0日として7日後以降）である治療方法。

[0131] ＜別実施形態：カクテル製剤＞

別実施形態のカクテル製剤を受益者の体内に戻入した際の作用を以下説明する。この説明の例では受益者は体内にがん細胞を有している。この別実施形態では、本願発明の製剤とは別に、採取した単球を分割して培養容器に入れ、本願発明で未成熟樹状細胞ヘリガンドとしてパルスした α -ガラクトシルセラミドの代わりにWT1ペプチドをリガンドした製剤を並行して別容器で作製し、本願発明の製剤と同時に受益者の体内に存在するように構成する。

[0132] α -ガラクトシルセラミドをリガンドとして使用した製剤は受益者の自然免疫系を活性化し免疫力向上をはかり、間接的に獲得免疫系をも活性化する。様々ながんが存在しているWT1ペプチドをリガンドとして使用した製剤の場合は、がん細胞を対象とした獲得免疫系を直接活性化する。

[0133] ＜カクテル製剤の作用＞

本別実施形態は、本願発明の製造方法によって製造した製剤と、類似の製造方法であって未成熟樹状細胞にパルスする薬品を α -ガラクトシルセラミドではなくWT-1ペプチドをパルスした製剤の2種類の製剤を利用する。非特異的免疫療法（製剤（リガンド： α -ガラクトシルセラミド））に関してはすでに説明済みのため、異なる部分である獲得免疫系を直接の目標としたWT-1ペプチドをリガンドした製剤の作用を主に以下説明する。受益者体内の、がん細胞は周囲に、免疫機能からのバリアを形成している（免疫抑制作用のため）。

[0134] < α -ガラクトシルセラミドがパルスされた製剤の作用：NK細胞の活性化作用>

α -ガラクトシルセラミドがパルスされた製剤は、NK細胞を活性化する。活性化NK細胞は、免疫機能に対して様々な作用をする。

[0135] <活性化NK細胞の作用：アジュバント作用>

活性化したNK細胞が、サイトカイン（IFN- γ ）を産生することで、NK細胞、マクロファージ、キラーT細胞を活性化し、がんへの攻撃力を高める。また、さまざまな免疫細胞を活性化する。キラーT細胞やヘルパーT細胞は、特異的免疫活性であるWT-1ペプチドをリガンドとして樹状細胞にパルスすることに起因して活性化されるものであり、この活性化したNK細胞や、活性化したB細胞が、非特異的免疫活性の経路による好影響を同時に受けることによって、単純な足し算以上の相乗効果が得られる。この点が本別実施形態の特徴の一つである。

[0136] <活性化NK細胞の作用：がん細胞に対するアポトーシス誘導作用>

活性化したNK細胞が、セリンプロテアーゼの一種を産生しがん細胞のDNAを分解することで、がん細胞のアポトーシスを引き起こす。

[0137] <活性化したマクロファージの作用：マクロファージによるがん細胞貪食作用>

活性化したマクロファージは、がん細胞やがん死細胞を貪食する。

[0138] <増殖・活性化マクロファージによる作用：マクロファージによる抗原提

示作用＞

活性化NK細胞は、マクロファージを増殖・活性化させる。増殖・活性化したマクロファージは、貪食作用によって取り込んだがん細胞を断片化して細胞表面に表出する。つまり、がん細胞の抗原を提示する抗原提示作用を奏する。マクロファージはこの抗原をヘルパーT細胞へ提示する。

[0139] ＜樹状細胞のがん抗原提示作用：樹状細胞によるがん抗原提示作用＞

未成熟樹状細胞はがん抗原を取り込んで成熟し成熟樹状細胞へと分化し、ヘルパーT細胞、およびキラーT細胞に対してがん抗原を提示する。本作用は、通常体内で起こりえる抗がん作用であるが、活性化NK細胞の作用により、通常以上に抗がん効果が得られる。このがん抗原は、患者自身のがん細胞を樹状細胞とマクロファージが貪食して提示された抗原なので、人工抗原をリガンドとして使用した製剤よりも高い効果が期待できる。本作用も、本願発明のカクテル製剤が相乗効果を奏する要因の一つである。

[0140] ＜WT1ペプチドがパルスされた製剤の作用：がん抗原提示作用＞

WT1ペプチドがパルスされた製剤は、ヘルパーT細胞、およびキラーT細胞に対して、がんの抗原であるWT1ペプチドを提示し、活性化する。これによりキラーT細胞は、がん細胞を攻撃対象として認識し、ヘルパーT細胞は、キラーT細胞を活性化し、さらにサイトカインを産生することで後述するようにNK細胞を活性化するとともに、B細胞が抗体を産生するのを促進する。

[0141] ＜活性化したヘルパーT細胞の作用：がん細胞攻撃指示＞

活性化したヘルパーT細胞はサイトカイン（ $\text{INF-}\gamma$ ）を産生して、そのサイトカイン中に含まれる情報に基づいてがん細胞に対する攻撃をキラーT細胞に対して指示する。また、サイトカインの効果によりNK細胞、B細胞やマクロファージが活性化することでがんへの攻撃作用が高まる。

[0142] ＜活性化したヘルパーT細胞の作用：がん抗原（例えばWT1）に対する抗体産生指示＞

活性化したヘルパーT細胞は、サイトカインを産生し、そのサイトカイン

に含まれる情報に基づいてB細胞に対して、がん抗原（例えばWT 1）に対する抗体を産生するよう指示する。

[0143] <活性化したキラーT細胞の作用：キラーT細胞によるがん細胞攻撃作用>

がん細胞を直接攻撃する主戦力となる作用で、活性化したキラーT細胞は、がん細胞に発現したWT 1を認識して結合し、細胞膜に穴をあけてがん細胞を壊死させる。さらに、TNF- β （腫瘍壊死因子、サイトカインの1種）などの物質を産生し、がん細胞のアポトーシスを誘導する。このように、キラーT細胞のがん細胞への直接攻撃は、がん細胞を外側と内側の両面から攻撃する強力な抗がん作用である。

[0144] <活性化したキラーT細胞の作用：新生血管破壊作用>

がん細胞により新生された血管は、WT 1遺伝子が発現しており、がん抗原（WT 1）を提示されたキラーT細胞は、がん細胞だけでなく、新生血管にも攻撃を行う。これにより、新生血管は破壊され、がん細胞への栄養の供給が低下し、がん細胞の増殖を抑える。本作用も、本別実施形態のカクテル製剤が相乗効果を奏する要因の一つである。

[0145] <活性化したNK細胞の作用：NK細胞によるがん細胞攻撃作用>

活性化NK細胞が産生するIFN- γ に加え、ヘルパーT細胞が産生するIFN- γ も加わって刺激され活性化したNK細胞は、がん細胞に対して細胞傷害性応答を示し、がん細胞を攻撃する。

[0146] <活性化したB細胞の作用：がん抗体産生>

活性化したB細胞は、がん抗原（例えばWT 1）に対する抗体を産生し、がん細胞を攻撃する。この抗体は、がん細胞と結合することでがん細胞の増殖を抑えたり、他の免疫細胞（例えばNK細胞やキラーT細胞）に対する目印になったりして攻撃を促進する作用などがある。

[0147] 以上のように、 α -ガラクトシルセラミドをリガンドとした製剤と、WT 1ペプチドをリガンドとした製剤を受益者の体内で同時に存在するように戻入させることにより、本願発明の製剤（ α -ガラクトシルセラミドをリガン

ドとした製剤)のみを使用するよりも早くがん細胞を対象とした獲得免疫系を活性化させることができ、自然免疫系と獲得免疫系双方を直接活性化することにより単純な足し算ではない相乗的な効果を得ることができる。そのためがん治療を目的とする場合には、本製剤単独よりも効果が早く、より大きな効果を得ることが期待できる。

[0148] <効果>

本願発明の、単球を採取した受益者の体内に戻入する、NK T細胞を刺激する樹状細胞製剤の製造方法によれば、先行技術(特許文献1)に対し、NK T細胞を刺激してIFN- γ をより多く産生させることができる条件を見出したことと、IFN- γ をより早く産生させる α -ガラクトシルセラミド濃度範囲を絞り込めたことによって、がん治療などにおいて自然免疫系、獲得免疫系双方の経路からの効果を一層期待することができ、より高い治療効果が期待される樹状細胞製剤を生成できるという優れた効果を奏し得る。さらに、前記樹状細胞製剤は健常者にとっても免疫力向上の効果を奏しうる。また受益者自身の単球から製造することにより、拒絶反応の心配のない安全な製剤を得ることができる。

請求の範囲

- [請求項1] がん治療、がん予防、免疫力向上のいずれか一以上を目的としたナチュラルキラーT（NK T）細胞を刺激する樹状細胞からなる樹状細胞製剤の製造方法であって、
- （１）受益者から採取（成分採血又は採血された単球、又は単球を含む末梢血）された単球を液体培地を用いた培養容器に入れ、静置して前記単球のうちの一部の細胞を容器の内面に接着させる接着工程と、
- 、
- （２）培養容器の内面に接着した細胞以外の単球を含む非接着細胞を除去する非接着細胞除去工程と、
- （３）前記培養容器に所定の因子を入れて、前記培養容器内面に接着した単球を未成熟樹状細胞に分化させる分化工程と、
- （４）前記未成熟樹状細胞が優位に存在する培養容器に α -ガラクトシルセラミドをパルスするパルス工程と、
- （５）未成熟樹状細胞から、NK T細胞を刺激する樹状細胞であるNK T刺激樹状細胞を誘導するNK T刺激樹状細胞誘導工程と、
- を含むことを特徴とする、前記単球を採取した受益者の体内に戻入しNK T細胞を刺激するためのNK T細胞刺激樹状細胞製剤の製造方法。
- [請求項2] （４）のパルス工程は、（３）の分化工程にて所定の因子を加えた日を０日として、３日乃至は４日目に行う請求項１に記載の樹状細胞製剤の製造方法。
- [請求項3] （４）のパルス工程は、（３）の分化工程にて所定の因子を加えてから６０時間後から１０８時間後までに行う請求項１に記載の樹状細胞製剤の製造方法。
- [請求項4] （４）のパルス工程は、（１）の接着工程にて受益者から採取された単球を培養容器に入れた日を０日として、４日目乃至は５日目に行う請求項１に記載の樹状細胞製剤の製造方法。

- [請求項5] (4) のパルス工程は、(1) の接着工程にて受益者から採取された単球を培養容器に入れてから84時間後から132時間後までに行う請求項1に記載の樹状細胞製剤の製造方法。
- [請求項6] (4) のパルス工程は、(2) の非接着細胞除去工程にて培養容器の内面に接着した細胞以外の単球を含む非接着細胞を除去した日を0日として、4日目乃至は5日目に行う請求項1に記載の樹状細胞製剤の製造方法。
- [請求項7] (4) のパルス工程は、(2) の非接着細胞除去工程にて培養容器の内面に接着した細胞以外の単球を含む非接着細胞を除去してから84時間後から132時間後までに行う請求項1に記載の樹状細胞製剤の製造方法。
- [請求項8] (4) のパルス工程においてパルスする α -ガラクトシルセラミドの濃度は300~1000 ng/mLである請求項1から請求項7のいずれか一に記載の樹状細胞製剤の製造方法。
- [請求項9] 請求項1から請求項7のいずれか一に記載の製造方法にて製造された樹状細胞製剤を加えた受益者の血液。
- [請求項10] 請求項8に記載の製造方法にて製造された樹状細胞製剤を加えた受益者の血液。