

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2008/023786

発行日 平成22年1月14日 (2010.1.14)

(43) 国際公開日 平成20年2月28日 (2008.2.28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 5/07 (2010.01)	C12N 5/00 E	4B063
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4B065
A61P 31/12 (2006.01)	A61P 31/12	4C087
A61K 35/14 (2006.01)	A61K 35/14 Z	
G01N 33/553 (2006.01)	G01N 33/553	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2008-530963 (P2008-530963)	(71) 出願人 390004097 株式会社医学生物学研究所 愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友商事丸の内ビル5F
(21) 国際出願番号 PCT/JP2007/066439	
(22) 国際出願日 平成19年8月24日 (2007.8.24)	
(31) 優先権主張番号 特願2006-228525 (P2006-228525)	(71) 出願人 304031427 愛知県 愛知県名古屋市中区三の丸三丁目1番2号
(32) 優先日 平成18年8月25日 (2006.8.25)	(74) 代理人 100108280 弁理士 小林 洋平
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 鈴木 進 日本国愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友商事丸の内ビル5F 株式会社医学生物学研究所内

最終頁に続く

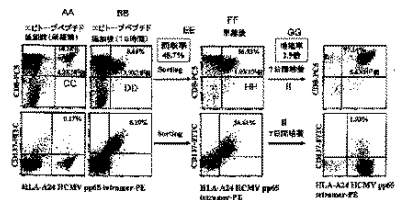
(54) 【発明の名称】 ウイルス特異的CTLの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 ウイルス（特に、HCMV）特異的CTLによる細胞治療の実用化を実現するため、簡便性と安全性を兼ね備え、しかも低コストで実施可能なウイルス特異的CTLの閉鎖系培養システムの提供すること。

【解決手段】 ウイルス特異的CTLエпитープペプチドと末梢血単核球とを混合培養した後、このエピトープペプチドと培地中で再刺激後、新たに発現するCD137抗原を標的として、ウイルス特異的CTLを単離し、OKT3（抗CD3モノクローナル抗体）の刺激で末梢血単核球から増殖させたT細胞と前記エピトープペプチドとを培地中で接触させた後に、このT細胞と前記ウイルス特異的CTLとを共培養することによって、ウイルス特異的CTLが増殖する。

【選択図】 2



AA: BEFORE ADDITION OF EPITOPE PEPTIDE (BEFORE ISOLATION)
 BB: AFTER ADDITION OF EPITOPE PEPTIDE (16 HOURS)
 CC: 4.2 X 10⁶ CELLS
 DD: 3.0 X 10⁶ CELLS
 EE: RECOVERY RATE: 46.7%
 FF: AFTER ISOLATION
 GG: PROLIFERATION RATIO: 2.9 TIMES
 HH: 1.8 X 10⁶ CELLS
 II: 7-DAY CULTURE
 JJ: 5.6 X 10⁶ CELLS

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

HTLV-1、インフルエンザ、アデノウイルス、エイズウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、エプスタインバーウイルス、ヒトパピローマウイルス、及びヒトサイトメガロウイルスからなる群から選択される一つのウイルス特異的CTLを誘導する方法であって、末梢血単核球とウイルス特異的CTLエピトープペプチドを混合培養することを特徴とするウイルス特異的CTLの誘導方法。

【請求項 2】

前記混合培養において、エピトープペプチドの培地中での終濃度が $0.01\mu\text{g/mL}$ – $10\mu\text{g/mL}$ であることを特徴とする請求項 1 に記載のウイルス特異的CTLの誘導方法。

10

【請求項 3】

前記混合培養に用いる培地として、5% – 10%自己血漿を含むRPMI1640を用い、エピトープペプチドを添加後、2日後に終濃度が10 IU/mLとなるようにIL-2を加え、その後IL-2濃度を2-3日ごとに2倍ずつ上げながら12日間-19日間培養することを特徴とする請求項 1 または 2 に記載のウイルス特異的CTLの誘導方法。

【請求項 4】

ウイルス特異的CTLを単離する方法であって、請求項 1～3のいずれかに記載の誘導方法、またはその他の方法で誘導されたウイルス特異的CTLを、誘導に用いたエピトープペプチドと同じエピトープペプチドと培地中で接触させることにより再刺激後、新たに発現するCD137抗原を標的として、ウイルス特異的CTLを単離することを特徴とするウイルス特異的CTLの単離方法。

20

【請求項 5】

ウイルス特異的CTLを単離する方法であって、請求項 1～3のいずれかに記載の誘導方法、またはその他の方法で誘導されたウイルス特異的CTLを、誘導に用いたエピトープペプチドと同じエピトープペプチドを提示した抗原提示細胞と培地中で接触させることにより再刺激後、新たに発現するCD137抗原を標的として、ウイルス特異的CTLを単離することを特徴とするウイルス特異的CTLの単離方法。

【請求項 6】

ウイルス特異的CTLを単離する方法であって、請求項 1～3のいずれかに記載の誘導方法、またはその他の方法で誘導されたウイルス特異的CTLを、誘導に用いたエピトープペプチドと同じエピトープペプチドと複合体を形成するMHC分子と培地中で接触させることにより再刺激後、新たに発現するCD137抗原を標的として、ウイルス特異的CTLを単離することを特徴とするウイルス特異的CTLの単離方法。

30

【請求項 7】

前記再刺激に用いるエピトープペプチドの培地中での終濃度が 0.1ng/mL – 1000ng/mL であることを特徴とする請求項 4～6のいずれかに記載のウイルス特異的CTLの単離方法。

【請求項 8】

前記再刺激は、5%–10%自己血漿と10 IU/mL～50 IU/mLのIL-2または10ng/mL IL-15のいずれかを含むRPMI1640培地中で8時間～15時間に渡って行うことを特徴とする請求項 4～7のいずれかに記載のウイルス特異的CTLの単離方法。

40

【請求項 9】

CD137抗原を標的とする際に、磁気標識した抗CD137抗体を用いることを特徴とする請求項 4～8のいずれかに記載のウイルス特異的CTLの単離方法。

【請求項 10】

CD137抗原を標的とする際に、抗CD137抗体を感作した固相を用いることを特徴とする請求項 4～8のいずれかに記載のウイルス特異的CTLの単離方法。

【請求項 11】

ウイルス特異的CTLの増殖方法であって、抗CD3モノクローナル抗体であるOKT3を用いて末梢血単核球から増殖させたT細胞と、請求項 1～3のいずれかにおいて誘導の際に用いたエピトープペプチドと同じエピトープペプチドとを培地中で接触させた後に、このT細胞

50

と、請求項4～10のいずれかに記載の単離方法で単離したウイルス特異的CTLまたは請求項1～3のいずれかに記載の誘導方法で誘導したウイルス特異的CTLとを共培養することを特徴とするウイルス特異的CTLの増殖方法。

【請求項12】

請求項11においてOKT3を用いて末梢血単核球から増殖させたT細胞を、ウイルス特異的CTLエピトープペプチドと培地中で接触させる際に、下記条件を用いることを特徴とする増殖方法。

- (a) 培地中に加えるエピトープペプチドの終濃度； $0.0001\mu\text{g/mL} \sim 10\mu\text{g/mL}$
- (b) 接触時間；30分間～60分間
- (c) 培養温度； $18^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$
- (d) 培地；血清、血漿など蛋白成分を含まないRPMI1640。

10

【請求項13】

請求項11において、以下の共培養条件を特徴とする増殖方法。

- (e) ウイルス特異的CTL：OKT3を用いて増殖させたT細胞の混合比；10:1～1:3
- (f) 培地組成 共培養開始後1日目～3日目まで；RPMI1640 (5%～10%自己血漿、10 IU/mL～50 IU/mL IL-2) またはRPMI1640(5%～10%自己血漿、10ng/mL IL-15)、共培養開始後3日目以降；ALyS505N (100 IU/mL～1000 IU/mL IL-2、0.1%～1%自己血漿) またはALyS505N (10ng/mL IL-15、0.1%～1%自己血漿)。

【請求項14】

請求項1～3のいずれかに記載の誘導方法によりウイルス特異的CTLを誘導する工程を含むウイルス特異的CTLの製造方法。

20

【請求項15】

請求項4～10のいずれかに記載の単離方法によりウイルス特異的CTLを単離する工程を含むウイルス特異的CTLの製造方法。

【請求項16】

請求項11～13のいずれかに記載の増殖方法によりウイルス特異的CTLを増殖する工程を含むウイルス特異的CTLの製造方法。

【請求項17】

請求項1～3のいずれかに記載のウイルス特異的CTLの誘導方法、請求項4～10のいずれかに記載のウイルス特異的CTLの単離方法、請求項11～14のいずれかに記載のウイルス特異的CTLの増殖方法をそれぞれ組み合わせることを特徴とするウイルス特異的CTLの製造方法。

30

【請求項18】

請求項14～17のいずれかに記載のウイルス特異的CTLの製造方法によって製造されたウイルス特異的CTL。

【請求項19】

請求項14～17のいずれかに記載のウイルス特異的CTLの製造方法によって製造されたウイルス特異的CTLを含むウイルス感染症の治療剤及び／または予防剤。

【請求項20】

請求項19に記載のウイルス感染症の治療剤及び／または予防剤を用いることを特徴とするウイルス感染症の治療方法及び／または予防方法。

40

【請求項21】

CTLの免疫応答能の検査方法であって、培地中で、(a)CTLエピトープペプチド、このCTLエピトープペプチドを提示した抗原提示細胞、または前記CTLエピトープペプチドと複合体を形成するMHC分子からなる群から選択される少なくとも一つの成分と、(b)被験者から採取したリンパ球、培養中のCTL、とを接触させながら共培養した後、前記リンパ球またはCTL上に新たに発現するCD137分子を検出することにより免疫応答能を判断することを特徴とする検査方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本発明は、ウイルス、特にヒトサイトメガロウイルス (human cytomegalovirus; 以下「HCMV」という) に対して特異的な細胞傷害性T細胞 (cytotoxic T lymphocyte; 以下「CTL」という) を調製する方法、およびこの方法により調製されたHCMV特異的CTLを用いたHCMV感染症の治療方法及び／又は予防方法に関する。

【背景技術】

【0002】

HCMVは、大部分の健常な成人において潜伏感染が認められる。通常免疫能を有する者については、HCMVの感染症状が出ることは希である。しかし、免疫抑制状態にある者（例えば、がん患者、造血幹細胞移植といった移植手術を受けた患者、エイズ患者など）においては、HCMVの感染症状が現れ、致命的な間質性肺炎のほか、網膜炎、肝炎などを引き起すことがある。

造血幹細胞移植は、白血病などの造血器腫瘍への適用にとどまらず、一部の固形腫瘍や代謝疾患にもその適用が広がっている。移植される幹細胞の起源は、HLA適合ドナーのみならず、骨髄バンク・臍帯血バンクやHLA不適合ドナーといった代替ドナーからの幹細胞を使用した症例数も増加している。これら代替ドナーからの移植のときには、移植患者に対して強力な免疫抑制治療を施すので、日和見感染症のリスクが高くなる。特に、HCMVの再活性化は移植患者のほぼ全例にみられるので、HCMV感染症の制御は移植手術後の大きな問題点のひとつである。ガンシクロビルは優れた抗ウイルス剤であり、HCMV感染症にも汎用されているが、頻回投与による副作用が度々問題となる。このため、HCMVを安全にかつ有効に制御する新しい方法が強く望まれている。

【0003】

HCMV感染細胞の活動を制御している主な免疫担当細胞は、HCMV感染細胞を特異的に認識するCD8⁺ CTL、すなわちHCMV特異的CTLである。HCMV特異的CTLは、HCMV感染細胞を発見すると、それを破壊する能力を持っているので、その機能を有効に活性化すれば、HCMV関連疾患の新しい予防法と治療法の開発につながる可能性が高い。従って、抗ウイルス剤に代わる新たな治療法として、HCMV特異的CTLによる細胞療法が注目されている。欧米においては、この細胞療法は既に応用研究が行われており、臨床試験において期待された効果が得られている（非特許文献1）。

【0004】

【非特許文献1】 ELIZABETH A. WALTER et al., N Eng J Med, 1995; 333: 1038-1044

【非特許文献2】 N Watanabe et al., Cytotherapy, 2004; 6(5): 514-522

【非特許文献3】 Mark Cobbold et al., J Exp Med., 2005; 202(3): 379-386

【非特許文献4】 Marek Cebecauer et al., J Immunol., 2005; 174(11): 6809-6819

【非特許文献5】 Foster AE, Gottlieb DJ, Marangolo M, Bartlett A, Li YC, Barton G W, Romagnoli JA, Bradstock KF. Rapid, large-scale generation of highly pure cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells for adoptive immunotherapy., J Hematother Stem Cell Res. 2003 Feb;12(1):93-105.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかし、これまで報告されているHCMV特異的CTLの調製方法は、以下に掲げた問題があるため、事業として応用されるまでには至っていない。

(1) HCMV特異的CTLを誘導させるために、抗原提示細胞の調製を必要とする。抗原提示細胞としては、樹状細胞が使われることが多いが、樹状細胞の調製は煩雑で費用が高む。

(2) 誘導したHCMV特異的CTLをさらに増殖させる場合に、樹状細胞が使われる（非特許文献5）。このため、上記(1)と同様の問題が生じる。また、増殖において使用する樹状細胞を調製するため、再度ドナーから採血する必要がある。更に、増殖時には誘導時に比べて、多数の樹状細胞が必要となることからドナーにかかる負担が大きい。

【0006】

(3) 誘導したHCMV特異的CTLをさらに増殖させる別の手段として、OKT3やレクチンによる非特異的な刺激を用いることがある。しかし、この方法では、相対的にHCMV特異的CTL以外のT細胞が増殖しやすいため効率性に欠ける。

また、非常に効率の良い増殖法としてREM法が知られている。REM法は大量の末梢血単核球と、EBV-LCLを必要とすることから、事業化において現実的な方法ではない。

(4) 誘導、増殖したHCMV特異的CTLの純度を高めるための方法として、MHC-tetramerを使ったHCMV特異的CTL単離法が一般化している（非特許文献3）。MHC-tetramerは、大腸菌由来の蛋白質を用いて作られるので、安全面での問題があることに加え、CTLの生存率が低下するという問題点がある（非特許文献4）。

また、純度を高めるための究極の手段として、HCMV特異的CTLのクローニングを行うことも報告されている。しかし、現在のところ、作業の効率、費用面から、この方法を事業化することは現実的ではない。

【0007】

(5) これまで行われているHCMV特異的CTL培養法は、抗原提示細胞を調製するなど、複雑なステップを経るので開放系培養に頼らざるを得ない。開放系での培養は、外部からの細菌、ウイルスなどの混入を防ぐため、細胞加工施設内で行う必要があり、莫大な設備費、管理費を要する。

(6) 日本人に多いHLA-A24に拘束性のHCMV特異的CTLについては、臨床応用に向けた体外での調製方法に関する報告はなされていない。HLA-A24拘束性HCMV特異的CTLが末梢血中に含まれる数は、欧米人に多いHLA-A2拘束性HCMV特異的CTLのそれに比べると百分の一程度である。これは、HLA-A24拘束性HCMV特異的CTLの体外での誘導、増殖が困難であること理由のひとつと考えられる。従って、日本においては、HLA-A24拘束性HCMV特異的CTLを体外で調製する方法を工夫する必要がある。

本発明は上記問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は、ウイルス（特に、HCMV）特異的CTLによる細胞治療の実用化を実現するため、簡便性と安全性を兼ね備え、しかも低コストで実施可能なウイルス特異的CTLの閉鎖系培養システムの提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

一般にCTLの調製工程（製造工程）は、CTL誘導工程、CTL単離工程、及びCTL増殖工程の3工程から構成される。本発明者らは、これら3工程において、適切な条件を求めることにより、簡便かつ安価にHCMV特異的CTLを調製する方法を発明した。

すなわち、本発明に係るHCMV特異的CTLの調製方法は、以下の通りである。

下記(1)～(3)は、CTLの誘導工程に関するものである。

(1) HTLV-1、インフルエンザ、アデノウイルス、エイズウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、エプスタインバーウイルス、ヒトパピローマウイルス、及びヒトサイトメガロウイルス（HCMV）からなる群から選択される一つのウイルス（特に、HCMV）特異的CTLを誘導する方法であって、末梢血単核球とウイルス特異的CTLエピトープペプチドを混合培養することを特徴とする誘導方法。

(2) 前記混合培養において、エピトープペプチドの培地中での終濃度が $0.01\mu\text{g/mL}$ – $10\mu\text{g/mL}$ であることを特徴とする上記(1)に記載の誘導方法。このとき、ウイルスがHCMVである場合には、HLA-A2拘束性エピトープであるNLVPMATV（配列番号1）では $0.05\mu\text{g/mL}$ – $2\mu\text{g/mL}$ 、HLA-A24拘束性エピトープであるQYDPVAALF（配列番号2）では $0.2\mu\text{g/mL}$ – $5\mu\text{g/mL}$ であることが好ましい。

【0009】

(3) 前記混合培養に用いる培地として、5%–10%自己血漿を含むRPMI1640を用い、エピトープペプチドを添加後、2日後に終濃度が 10IU/mL となるようにIL-2を加え、その後IL-2濃度を2–3日ごとに2倍ずつ上げながら12日間–19日間培養することを特徴とする上記(1)または(2)に記載の誘導方法。

下記(4)～(10)は、CTLの単離工程に関するものである。

(4) ウイルス特異的CTLを単離する方法であって、上記(1)～(3)のいずれかに記載の誘導方法、またはその他の方法で誘導されたウイルス特異的CTLを、誘導に用いたエピトープペプチドと同じエピトープペプチドと培地中で接触させることにより再刺激後、新たに発現するCD137抗原を標的として、ウイルス特異的CTLを単離することを特徴とする単離方法。

(5) ウイルス特異的CTLを単離する方法であって、上記(1)～(3)のいずれかに記載の誘導方法、またはその他の方法で誘導されたウイルス特異的CTLを、誘導に用いたエピトープペプチドと同じエピトープペプチドを提示した抗原提示細胞と培地中で接触させることにより再刺激後、新たに発現するCD137抗原を標的として、ウイルス特異的CTLを単離することを特徴とするウイルス特異的CTLの単離方法。

(6) ウイルス特異的CTLを単離する方法であって、上記(1)～(3)のいずれかに記載の誘導方法、またはその他の方法で誘導されたウイルス特異的CTLを、誘導に用いたエピトープペプチドと同じエピトープペプチドと複合体を形成するMHC分子と培地中で接触させることにより再刺激後、新たに発現するCD137抗原を標的として、ウイルス特異的CTLを単離することを特徴とするウイルス特異的CTLの単離方法。

(7) 前記再刺激に用いるエピトープペプチドの培地中での終濃度が0.1ng/mL～1000ng/mLであることを特徴とする上記(4)～(6)に記載の単離方法。このとき、ウイルスがHCMVである場合には、1ng/mL～10ng/mLであることが好ましい。

【0010】

(8) 前記再刺激は、5%～10%自己血漿と10 IU/mL～50 IU/mLのIL-2または10ng/mL IL-15のいずれかを含むRPMI1640培地中で8時間～15時間に渡って行うことを特徴とする上記(4)～(7)に記載の単離方法。

(9) CD137抗原を標的とする際に、磁気標識した抗CD137抗体を用いることを特徴とする上記(4)～(8)のいずれかに記載の単離方法。

(10) CD137抗原を標的とする際に、抗CD137抗体を感作した固相を用いることを特徴とする上記(4)～(8)のいずれかに記載の単離方法。

また、上記(1)～(3)の誘導方法、および(4)～(10)の単離方法については、ウイルス特異的CTLとは、ウイルス特異的CD8⁺ CTLに加えて、ウイルス特異的CD4⁺ T細胞も含まれる。

下記(11)～(13)は、CTLの増殖工程に関するものである。

(11) ウイルス特異的CTLの増殖方法であって、OKT3(抗CD3モノクローナル抗体)を用いて末梢血単核球から増殖させたT細胞と、上記(1)～(3)のいずれかにおいて誘導の際用いたエピトープペプチドと同じエピトープペプチドとを培地中で接触させた後に、このT細胞と、上記(4)～(10)のいずれかに記載の単離方法で単離したウイルス特異的CTLまたは(1)～(3)のいずれかに記載の誘導方法で誘導したウイルス特異的CTLとを共培養することを特徴とするウイルス特異的CTLの増殖方法。

【0011】

(12) 上記(11)においてOKT3を用いて末梢血単核球から増殖させたT細胞を、ウイルス特異的CTLエピトープペプチドと培地中で接触させる際に、下記条件を用いることを特徴とする増殖方法。

(a) 培地中に加えるエピトープペプチドの終濃度； 0.0001 μ g/mL～10 μ g/mL

(b) 接触時間； 30分間～60分間

(c) 培養温度； 18℃～25℃

(d) 培地； 血清、血漿など蛋白成分を含まないRPMI1640。

(13) 上記(11)において、以下の共培養条件を特徴とする増殖方法。

(e) ウイルス特異的CTL； OKT3を用いて増殖させたT細胞の混合比； 10:1～1:3

(f) 培地組成 共培養開始後1日目～3日目まで； RPMI1640(5%～10%自己血漿、10 IU/mL～50 IU/mL IL-2)またはRPMI1640(5%～10%自己血漿、10ng/mL IL-15)、共培養開始後1日目～3日目以降； ALyS505N(100 IU/mL～1000 IU/mL IL-2、0.1%～1%自己血漿)

またはALyS505N (10ng/mL IL-15、0.1%~1%自己血漿)。

【0012】

(14) 上記(1)~(3)のいずれかに記載の誘導方法によりウイルス特異的CTLを誘導する工程を含むウイルス特異的CTLの製造方法。

(15) 上記(4)~(10)のいずれかに記載の単離方法によりウイルス特異的CTLを単離する工程を含むウイルス特異的CTLの製造方法。

(16) 上記(11)~(13)のいずれかに記載の増殖方法によりウイルス特異的CTLを増殖する工程を含むウイルス特異的CTLの製造方法。

(17) 上記(1)~(3)のいずれかに記載のウイルス特異的CTLの誘導方法、上記(4)~(10)のいずれかに記載のウイルス特異的CTLの単離方法、上記(11)~(14)のいずれかに記載のウイルス特異的CTLの増殖方法をそれぞれ組み合わせることを特徴とするウイルス特異的CTLの製造方法。

(18) 上記(14)~(17)のいずれかに記載のウイルス特異的CTLの製造方法によって製造されたウイルス特異的CTL。

【0013】

(19) 上記(14)~(17)のいずれかに記載のウイルス特異的CTLの製造方法によって製造されたウイルス特異的CTLを含むウイルス感染症の治療剤及び/または予防剤。

(20) 上記(19)に記載のウイルス感染症の治療剤及び/または予防剤を用いることを特徴とするウイルス感染症の治療方法及び/または予防方法。

(21) CTLの免疫応答能の検査方法であって、培地中で、(a)CTLエピトープペプチド、このCTLエピトープペプチドを提示した抗原提示細胞、または前記CTLエピトープペプチドと複合体を形成するMHC分子からなる群から選択される少なくとも一つの成分と、(b)被験者から採取したリンパ球または培養中のCTLとを接触させながら共培養した後、前記リンパ球またはCTL上に新たに発現するCD137分子を検出することにより免疫応答能を判断することを特徴とする検査方法。

なお、上記については、ウイルスのエピトープペプチドに対して応用できる製造方法等を説明したが、本発明に関する技術は、その他のペプチド(例えば、腫瘍抗原)についても応用できる。

【発明の効果】

【0014】

CTL誘導工程、CTL単離工程、及びCTL増殖工程の各工程からなるCTLの調製工程(製造工程)は、いずれも煩雑で高コストであるため、CTLを用いた細胞治療の実用化において障害となってきた。本発明のウイルス(特に、HCMV)特異的CTLの調製方法は、簡便で安価なHCMV特異的CTLの調製を可能とした。例えば、CTLの誘導工程は従来、樹状細胞などの抗原提示細胞とリンパ球を共培養することにより行われてきた。樹状細胞などの抗原提示細胞の調製は煩雑で、その調製には多大な労力と経費が必要であった。これに対し、本発明による誘導工程は、抗原提示細胞の調製が不要であるため、迅速かつ簡便にウイルス特異的CTLの誘導を行える。

【0015】

また、CTL増殖工程においても、従来の方法では樹状細胞を必要とするため、前記と同様の問題点があった。本発明によるウイルス特異的CTLの増殖工程は、抗原提示細胞としてOKT3で増殖させたT細胞に代替することによって簡便で安価なウイルス特異的CTLの増殖を可能とした。さらに、CTL単離工程においてはMHC-tetramerを用いることが一般的となっているが、MHC-tetramerは大腸菌由来の蛋白質であることから安全面での問題があることに加え、CTL単離後の生存率の低下が指摘されている。また、CD107抗原やインターフェロンガンマ(IFNg)を標的として、CTLを単離する方法が知られている(Leukemia (2005)

19, 707-709)。しかしながら、この方法では、CTLを単離したときの収率が悪いという欠点が知られている。本発明においては、CD137抗原を標的とした単離方法を樹立することにより、このような問題点を克服した。すなわち、CD137抗原を標的とすれば、生存率

を低下させることなく安全にウイルス特異的CTLの単離が可能となる。

【0016】

HCMVは免疫抑制状態にある患者、例えば造血幹細胞移植後の患者においては、ほぼ100%の確率で再活性化し、致命的な感染症を引き起こす。従って、その制御は患者の予後を左右する重要な問題である。従来HCMVの制御にはガンシクロビル等の抗ウイルス薬が使用されているが、頻回投与による副作用の問題があり、より安全で効果的な、予防薬、治療薬の開発が望まれていた。HCMV特異的CTLは、HCMV感染細胞を特異的に認識し、かつ極めて強力な細胞傷害活性を有している。

本発明によれば、安全で効果的なウイルス特異的CTLによるウイルス予防薬、治療薬、及び、これを簡便で安価に調製する技術を提供することができる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

次に、本発明の実施形態について、図面を参照しつつ詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は、下記の実施形態によって限定されるものではなく、その要旨を変更することなく、様々に改変して実施することができる。また、本発明の技術的範囲は、均等の範囲にまで及ぶものである。

以下、本発明の実施形態については、ウイルスの代表としてHCMVを例にとって説明するが、その他のウイルス（HTLV-1、インフルエンザ、アデノウイルス、エイズウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、エプスタインバーウイルス、ヒトパピローマウイルス）についても同様に実施することができる。CTLの製造について、(1) HCMV特異的CTLの誘導工程、(2) HCMV特異的CTLの単離工程、および(3) HCMV特異的CTLの増殖工程の三つに分けて説明する。

20

【0018】

まずHCMV特異的CTLの誘導工程について説明する。

本実施形態におけるHCMV特異的CTLの誘導方法（以下、「本実施形態の誘導方法」という。）では、末梢血単核球とHCMV特異的CTLエピトープペプチドを血漿を含む培地中で接触させながら培養する。「CTLエピトープペプチド」とは、隣接するアミノ酸残基の α -アミノ基とカルボキシル基間のペプチド結合により相互に結合した線状のアミノ酸の分子鎖であって、ヒト白血球抗原(human leucocyte antigen、以下「HLA」という。)クラスI分子と複合体を形成し、HCMV特異的CTL上に発現するT細胞レセプターと結合性を有するペプチドを意味する。T細胞に対する抗原提示は、抗原提示細胞上に発現するMHCとペプチドとの複合体（以下、「MHC-ペプチド複合体」という）がT細胞受容体(TCR)に認識され、かつ抗原提示細胞上のB7-1、B7-2等の補助分子がT細胞側の補助分子であるCD28等と結合することによってなされる。本実施形態の誘導方法においては、末梢血単核球に含まれる単球、B細胞、微量に含まれる樹状細胞等の膜表面上に発現するHLAクラスI分子とCTLエピトープペプチドが複合体を形成し、抗原提示細胞として機能するものと考えられる。

30

【0019】

従って、本実施形態における誘導方法においては、従来必要とされた樹状細胞などの抗原提示細胞を調製する必要がなく、誘導工程を大幅に縮小することができるので、簡便、迅速、かつ安価にHCMV特異的CTLを誘導することが可能となる。抗原提示の際に起こるMHC-ペプチド複合体とTCRとの結合は、適度な結合力によって起こることが、抗原提示能を高めるために重要である（結合力が強すぎても抗原提示能が高まるとは言えない）。このため、加えるCTLエピトープペプチドの濃度は、抗原提示の効果を左右する。HLA-A2拘束性のHCMVエピトープペプチド(NLVPMVATV:配列番号1)においては、終濃度が $0.05\mu\text{g/mL}$ – $2\mu\text{g/mL}$ であることが望ましい。また、HLA-A24拘束性のHCMVエピトープペプチド(QYD PVAALF:配列番号2)においては、終濃度が $0.2\mu\text{g/mL}$ – $5\mu\text{g/mL}$ であることが望ましい。

40

【0020】

HLAは、人種間、個人間によって異なっている。HLAが異なると、同じ抗原であってもエピトープペプチドが異なる（これをエピトープペプチドのHLA拘束性という）。日本人の約80%が保有し、かつ世界的に最も頻度の高いHLA-A24型、およびHLA-A2型に拘束性のHCM

50

Vエピトープペプチドの誘導工程における至適濃度が明らかとなった。

次に、本実施形態における誘導方法において、培養条件の詳細を説明する。基礎培地としては、5%~10%自己血漿を含むRPMI1640、AIM-Vまたはダルベッコ変法イーグル培地(Dulbecco's modified eagle medium)が望ましく、末梢血単核球と該CTLエピトープペプチドを混合2日後に終濃度が10 IU/mLになるようにIL-2を加え、その後、2-3日おきにIL-2の濃度を2倍ずつ高めながら前記培地を用いると尚効果的である。培養中の炭酸ガス濃度、温度及び培養日数はそれぞれ5%、37℃、14-21日間が好ましい。また、細胞濃度としては、 $10^6 \sim 2 \times 10^6$ 個/mLが好ましい。さらに細胞同士を密着させながら培養することが効率的な抗原提示にとって重要であり、そのためには、底がU字状となった培養容器中で培養することが好ましい。

10

【0021】

次に、HCM特異的CTLの単離工程について説明する。本発明におけるHCM特異的CTLの単離方法(以下、「本実施形態における単離方法」という。)は、本実施形態における誘導方法により誘導したHCM特異的CTLとHCM特異的CTLエピトープペプチドを血漿を含む培地中で接触させながら培養することによりHCM特異的CTL上に新たに発現するCD137分子を標的として単離することを特徴とする。

CD137分子(4-1BB, ILAともいう)はKwon BSらにより同定された分子で、CTLの分化、増殖に関連し、TCRを介した刺激によりCTL上に選択的に発現することが知られている。従ってHCM特異的CTLを含むT細胞集団にエピトープペプチドを加えることにより、培地中に含まれるT細胞上には、HLAクラスI分子とエピトープペプチドから成る複合体が発現する。この複合体とHCM特異的CTL上のTCRが接触し、HCM特異的CTL上に選択的にCD137分子が発現する。このHCM特異的CTLは、例えばCD137抗体をコートした磁性微粒子のように、CD137分子を認識する物質と反応させた後、適当な分離装置(例えば、磁気分離装置)を用いて、HCM特異的CTLを単離することができる。

20

【0022】

なお、CD137抗体をコートした磁性微粒子の代わりに、CD137抗体をコートした培養プレートを用い、パンニング法により単離することもできる。抗CD137抗体としてはモノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であっても良い。培地中に添加するエピトープペプチドの終濃度としては1 ng/mL - 10 ng/mLが効果的である。HCM特異的CTLは、エピトープペプチドを培地中に加えた後に最もCD137抗原の発現が高まる15時間~24時間後に単離することが望ましい。なお、単離工程において、CD137抗体とHCM特異的CTLが接触する際、CD137分子から刺激が細胞内に伝達されるので、HCM特異的CTLの増殖を高める効果も期待される。

30

【0023】

次に、HCM特異的CTLの増殖工程について説明する。本実施形態におけるHCM特異的CTLの増殖方法(以下、「本実施形態における増殖方法」という。)は、OKT3(CD3モノクローナル抗体)を用いて増殖させたT細胞にエピトープペプチドを接触させることにより、このT細胞上にHLAクラスI分子とエピトープペプチドから成る複合体を形成させ、これと本実施形態における単離方法により調製したHCM特異的CTL上に発現するTCRを接触させることにより、HCM特異的CTLを増殖させることを特徴とする。末梢血単核球をOKT3で刺激することにより増殖させたT細胞(以下、「OKT3-T細胞」という。)上には副刺激分子であるCD80及び、CD86分子が高発現するので、抗原提示細胞として用いることができる。従来、CTL増殖工程において抗原提示細胞として樹状細胞が用いられることが一般的であり、その調製には高価で、煩雑な操作が必要であった。また、CTL増殖工程においては、大量の樹状細胞が必要で(非特許文献5)、新たにドナーから採血しなければならず、ドナーにかかる負担が大きかった。本実施形態による増殖方法においては、CTL誘導の際に採血した血液の一部を使って、OKT3で刺激し、増殖させて得られるT細胞を抗原提示細胞とするため、従来法に比べて、簡便かつ低コストでHCM特異的CTLを増殖させることができる。抗原提示細胞として用いるOKT3-T細胞上のCD80、CD86の発現量が多いほど良い。PBMCをOKT3で刺激後、CD80、CD86の発現量が最も高くなる2週間~1ヶ月間培養したT細胞を用いるこ

40

50

とが望ましい。

【0024】

次に、OKT3-T細胞（OKT3を用いて増殖させたT細胞；抗原提示細胞）とエピトープペプチドを培地中で接触させる際の条件について以下に記す。培地中に加えるエピトープペプチドの終濃度は、 $0.1\mu\text{g/mL}$ ～ $10\mu\text{g/mL}$ が好ましい。培地としては、血清、血漿などの蛋白成分を含まないRPMI1640、AIM-V、またはダルベッコ変法イーグル培地(Dulbecco's modified eagle medium)が好ましい。接触時間は30分間～60分間、接触温度は 18°C ～ 25°C が好ましい。この条件でOKT3-T細胞とエピトープペプチドを接触させた後は、遊離のエピトープペプチドを除去するため、RPMI1640などで複数回（例えば、3回程度）に渡って洗浄することが好ましい。このようにして調製された抗原提示細胞とHCM特異的CTL（例えば、本実施形態における単離方法により単離したもの）を共培養することにより、HCM特異的CTLを増殖させる。HCM特異的CTLと抗原提示細胞の混合比は、10:1～1:3の間で任意に選択できる。

10

【0025】

なお、抗原提示細胞がHCM特異的CTLに対して過剰に混合された場合には、HCM特異的CTLに対してActivation Induced Cell Death (AICD)による細胞死が誘導されるので注意を要する。AICDを防止するために、カスパーゼ阻害剤であるZ-VAD-FMKを終濃度が $20\mu\text{M}$ ～ $40\mu\text{M}$ となるように加えることができる。HCM特異的CTLと抗原提示細胞との共培養に用いられる培地としては、5%～10%自己血漿、 10 IU/mL ～ 50 IU/mL のIL-2を含むRPMI1640、AIM-V、またはダルベッコ変法イーグル培地(Dulbecco's modified eagle medium)を用いることが好ましい。共培養開始後、18時間～36時間後に、培地を1%自己血漿を含むALYS505N-1000に入れ替え、その後、同培地を2～3日に一度、全体の半分を入れ替えることが好ましい。

20

上記の工程を経ることにより、HCM特異的CTLを誘導、単離、及び増殖することができる。次に、実施例を説明することにより、本発明を更に詳細に説明する。

【実施例】

【0026】

以下に実施例を参照しつつ、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。また、本発明の技術的範囲は均等の範囲にまで及ぶものである。

なお、本実施例においては、HCM特異的CTLとは、HCM特異的 CD8^+ CTLを意味している

30

〔実施例1〕 HCM特異的CTLの誘導工程

HLA-A24分子保持者、またはHLA-A2保持者由来の末梢血より分離した末梢血単核球(PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell)を5%自己血漿、2-メルカプトエタノール、L-グルタミン、抗生物質としてペニシリンとストレプトマイシンを含むHEPES緩衝RPMI1640培地(以下、「CTL誘導用培地」という)1mL中に細胞数が 2×10^6 個となるように懸濁させ、ポリプロピレン製14mLの丸底チューブ(Becton Dickinson社製)に1mL分注した。 $4\mu\text{g/mL}$ のHLA-A24拘束性HCM特異的CTLエピトープペプチドQYD(配列番号2:以下、「QYDペプチド」という)、若しくは $2\mu\text{g/mL}$ のHLA-A2拘束性HCM特異的CTLエピトープペプチドNLV(配列番号1:以下、「NLVペプチド」という)を含むCTL誘導用培地1mLを添加後、2日間、5% CO_2 インキュベータ内において、 37°C で培養した。その後、IL-2を 10 IU/mL となるように添加した後、3日おきに、培地1mLを、 50 IU/mL のIL-2を含むCTL誘導用培地と入れ替えながら12日間、5% CO_2 インキュベータ内において、 37°C で培養した。こうして、HCM特異的CTLを誘導し、HCM特異的CTLラインとした。

40

【0027】

〔実施例2〕 HCM特異的CTLの誘導効率の検討

実施例1の方法によるHCM特異的CTLの誘導効率を誘導前後のHCM特異的CTLの数を比較することにより検討した。HCM特異的CTLの数は培養中に含まれる総細胞数とHCM特異的MHC-tetramerにより測定したHCM特異的CTL陽性率を乗ずることにより算出した。HCM特異的CTL陽性率のHCM特異的MHC-tetramerによる測定は、以下のように行った。

50

測定に用いる細胞を、0.1%BSAを含むPBS(以下、「細胞洗浄緩衝液」という)で洗浄後、細胞濃度が 2×10^6 個/mLとなるように細胞洗浄緩衝液に懸濁させ、その $100 \mu\text{L}$ にフィコエリトリン (Phycoerythrin; 以下「PE」という) を標識したHCMV特異的MHC-tetramer $10 \mu\text{L}$ とPC5標識したCD8モノクローナル抗体 $10 \mu\text{L}$ を同時に混合させた後、 4°C で30分間反応させた。PBSで2回洗浄後、細胞を $500 \mu\text{L}$ の細胞洗浄緩衝液に懸濁させ、フローサイトメーターを用いて測定した。

【0028】

図1には、測定結果の一例を示した。縦軸はCD8蛍光強度、横軸はHCMV特異的MHC-tetramerの蛍光強度を対数尺で示し、個々の打点は各細胞の蛍光強度を表す。4分割した左上の領域の打点は、CD8とMHC-tetramerが同時に陽性細胞、すなわち、HCMV特異的CTLを表す。誘導後の細胞中に、10.28%のHCMV特異的CTLが含まれていた。後に示す表1には、誘導前後における、総細胞数、HCMV特異的CTLの割合及び数を示し、さらに誘導効率を誘導前のHCMV特異的CTL数に対する、誘導後のHCMV特異的CTL数の比として表現した。

【0029】

〔実施例3〕 HCMV特異的CTLの単離、及び濃縮

1. CD137モノクローナル抗体を感作した培養プレートによる単離

(1) CD137モノクローナル抗体感作培養プレートの作製

PBSで $10 \mu\text{g/mL}$ に希釈したCD137モノクローナル抗体(クローン4B4)を6ウェルプレートに 1 mL 分注し、 4°C で18時間、静置反応させた。抗体溶液をアスピレーターで除去後、5%ヒトアルブミンを含むPBSを 2 mL 分注し、 37°C で1時間インキュベートし、抗体が感作された培養プレート表面をブロックした。PBSで3回プレート表面を洗浄した後、CD137モノクローナル抗体感作培養プレートとして用いた。

【0030】

(2) HCMV特異的CTLエピトープペプチドによるHCMV特異的CTLラインの再刺激とCD137分子の発現解析

実施例1で誘導したHLA-A24拘束性HCMV特異的CTLライン培養中にQYDペプチドを終濃度 100 ng/mL に加え、18時間培養した。細胞の一部を採取し、HCMV特異的CTL上に選択にCD137が発現していることを確認するため、PC5標識CD137モノクローナル抗体とPE標識HCMV特異的MHC-tetramerを用いて二重染色を行い、フローサイトメーターにより解析した。図2に示すように、HCMV特異的CTL(MHC-tetramer 陽性細胞として示された細胞集団)上にCD137分子の選択的発現を認めた。

【0031】

(3) HCMV特異的CTLの単離、及び培養

QYDペプチドにより再刺激したHLA-A24拘束性HCMV特異的CTLラインを、CD137モノクローナル抗体を感作した培養プレートに移し、1時間、5% CO_2 インキュベータ内において、 37°C で反応させ、CD137分子を発現したHCMV特異的CTLをCD137モノクローナル抗体を介して、培養プレート表面に接着させた。培養プレートを軽く揺らした後、ピペットを用いて、培養プレート表面に接着していない細胞を除去した。その後、0.5%ヒトアルブミンを含むHEPES緩衝RPMI培地で洗浄をゆっくりと 1 mL に加え、軽く揺らした後、再度、ピペットを用いて、培養プレート表面に接着していない細胞を除去した。さらにこの操作を2回繰り返した後、 50 IU/mL のIL-2を含むCTL誘導用培地を 1 mL に加え、5% CO_2 インキュベータ内において、 37°C で24時間培養した。さらにALY5505N-1000培地を 1 mL 添加し、5% CO_2 インキュベータ内において、 37°C で6日間培養した。

【0032】

(4) 単離、及び培養したHCMV特異的CTLの純度と回収率の解析

単離、及び培養したHLA-A24拘束性HCMV特異的CTLを、 10^6 /mLの細胞濃度で細胞洗浄緩衝液に浮遊させ、その $100 \mu\text{L}$ にPEを標識したHCMV特異的MHC-tetramer $10 \mu\text{L}$ とFITC標識したCD8モノクローナル抗体 $10 \mu\text{L}$ を同時に混合させた後、 4°C で30分間反応させた。PBSで2回洗浄後、細胞を $500 \mu\text{L}$ の細胞洗浄緩衝液に懸濁させ、フローサイトメーターを用いて測定した。

図2に示すように、単離前10.28%であったHLA-A24拘束性HCMV特異的CTLの純度が、単離直後では56.03%に、また、培養一週間後97.14%に上昇した。また、単離直後において48.7%のHCMV特異的CTLが回収され、その後1週間の培養で、2.9倍に増殖した(表1)。

【0033】

【表1】

HCMV特異的CTLの誘導効率

Donor	HLA型	誘導前のPBMC数 x 10 ⁶ 個	誘導後の総T細胞数 x 10 ⁶ 個	誘導前のTetramer陽性細胞数/陽性細胞率 x 10 ⁶ 個 / %	誘導後のTetramer陽性細胞数/陽性細胞率 x 10 ⁶ 個 / %	Tetramer陽性細胞増殖率
A2-3	A2	2	6.0	0.0056 / 0.28	1.69 / 28.1	301.8
A24-1	A24	2	2.87	<0.0002 / <0.01	0.95 / 33.2	>4750.0
A24-2	A24	2	1.32	<0.0002 / <0.01	0.15 / 11.3	>750.0
A24-10	A24	2	1.44	<0.0002 / <0.01	0.29 / 20	>1450.0

10

20

30

40

【0034】

50

2.細胞自動分離装置を用いた単離

(1) CD137モノクローナル抗体を用いた単離

上記1(2)の方法に従い、HLA-A24拘束性HCMV特異的CTLラインをQYDペプチドにより再刺激した後、細胞洗浄緩衝液100 μ Lに懸濁した後、100 μ g/mL CD137モノクローナル抗体(クローン4B4)を10 μ L加え、攪拌の後、室温で15分間反応させた。細胞洗浄緩衝液で2回洗浄し、細胞を0.5%ヒトアルブミン、2 mM EDTAを含むPBS(以下、「細胞分離緩衝液」という)80 μ Lに細胞を懸濁させた後、抗マウスIgG結合マイクロ磁性ビーズ(ミルテニ社製)を20 μ L加え、攪拌後、4 $^{\circ}$ Cで15分間反応させた。細胞分離緩衝液で2回洗浄後、500 μ Lの細胞分離緩衝液に懸濁させた後、細胞自動分離装置(AutoMACS:ミルテニ社製)を用いて、CD137陽性細胞、すなわちHLA-A24拘束性HCMV特異的CTLを分離した。

10

【0035】

(2) MHC-tetramerを用いた単離

HLA-A24拘束性HCMV特異的CTLラインを細胞洗浄緩衝液100 μ Lに懸濁した後、HCMV特異的HLA-A24-tetramer((株)バックマンコールター社製)を10 μ L加え、攪拌の後、室温で15分間反応させた。細胞洗浄緩衝液で2回洗浄し、細胞を0.5%ヒトアルブミン、2 mM EDTAを含むPBS(以下細胞分離緩衝液という)80 μ Lに細胞を懸濁させた後、抗PE抗体結合マイクロ磁性ビーズ(ミルテニ社製)を20 μ L加え、攪拌後、4 $^{\circ}$ Cで15分間反応させた。細胞分離緩衝液で2回洗浄後、500 μ Lの細胞分離緩衝液に懸濁させた後、細胞自動分離装置(AutoMACS:ミルテニ社製)を用いて、HCMV特異的HLA-A24-tetramer陽性細胞、すなわちHLA-A24拘束性HCMV特異的CTLを分離した。

20

図3に細胞自動分離装置を用いた単離の結果を示した。CD137モノクローナル抗体を用いた単離においては、HLA-A24拘束性HCMV特異的CTLの回収率74.1%、純度80.82%であった。一方、MHC-tetramerを用いた単離においては回収率34.0%、純度80.15%であった。純度については両者の間で差はみられなかったが、回収率の点ではCD137モノクローナル抗体を用いた方法がMHC-tetramerを用いた方法に比べて優れていた。

【0036】

〔実施例4〕HCMV特異的CTLの増殖

1. OKT3-T細胞の調製

HCMV特異的CTLの誘導の際に分離したPBMCの一部(2×10^6 個)を1 μ g/mLの濃度でOKT3を含むCTL誘導用培地10mLに懸濁させ、5% CO₂ インキュベータ内で2日間、37 $^{\circ}$ Cで培養した。ALyS505N-1000培地を10 mL添加後、5% CO₂ インキュベータ内で12日間、37 $^{\circ}$ Cで培養し、OKT3-T細胞を得た。

30

【0037】

2. OKT3-T細胞を用いたHCMV抗原提示細胞の調製

上記1で調製したOKT3-T細胞 10^7 個を細胞洗浄緩衝液で2回洗浄の後、1 μ g/mL HCMV特異的CTLエピトープペプチドを含む1 mL HEPES緩衝RPMI1640培地に懸濁させ、25 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた。細胞洗浄緩衝液で2回洗浄し、HCMV抗原提示細胞とした。

3. HCMV抗原提示細胞との共培養によるHCMV特異的CTLの増殖

〔実施例3〕1に示した方法で単離したHLA-A24拘束性HCMV特異的CTL 4×10^6 個を4 mLの50IU/mL IL-2を含むCTL誘導用培地に懸濁させ、上記2で調製したHCMV抗原提示細胞 2×10^6 個を添加した後、5% CO₂ インキュベータ内で24時間、37 $^{\circ}$ Cで培養した。ALyS505N-1000培地を4 mL加えた後、さらに8日間培養した。培養後、一部を採取し、総細胞数を血球計算版にて測定し、HLA-A24拘束性HCMV特異的CTLの割合を実施例2と同様に、フローサイトメーターにより計測した。また、HLA-A24拘束性HCMV特異的CTLの数は総細胞数とフローサイトメーターを用いて計測した割合を掛けることにより求めた。

40

図4には、増殖前後のフローサトメトリー像を示した。HCMV特異的CTLの割合は、増殖前98.5%、増殖後97.68%とほとんど変わらなかった。一方、HLA-A24拘束性HCMV特異的CTL数は、 4×10^6 個から、 4.1×10^7 個とほぼ10倍に増殖した。

【0038】

このように本実施形態によれば、簡便かつ安価に、HCMV特異的CTLの調製を行うことが

50

できた。HCM特異的CTL誘導工程では、抗原提示細胞の調製が不要であるため、迅速かつ簡便にHCM特異的CTLの誘導を行えた。また、HCM特異的CTL増殖工程では、抗原提示細胞としてOKT3で増殖させたT細胞に代替することによって、簡便で安価なHCM特異的CTLの増殖が可能であった。さらに、HCM特異的CTL単離工程においては、CD137抗原を標的とした単離方法を樹立することにより、生存率を低下させることなく安全にHCM特異的CTLの単離が可能となった。

HCM特異的CTLをヒトCMV患者に投与することにより、症状の改善が認められることが複数の論文によって示されている（例えば、非特許文献1、非特許文献3、BLOOD 2002;99:3916-3922）。HCM特異的CTLは、HCMV感染細胞を特異的に認識し、かつ極めて強力な細胞傷害活性を有しているため、これを用いることにより、安全で効果的なHCMV特異的CTLによるHCMV予防薬、治療薬、及びこれを簡便で安価に調製する技術を提供することができる。

。 【図面の簡単な説明】

【0039】

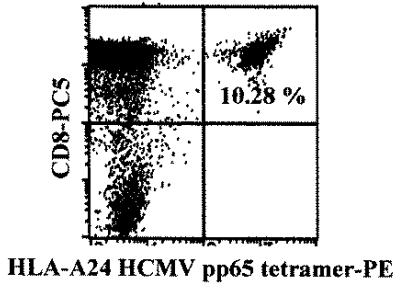
【図1】 HCM特異的CTLの誘導例を示すためのサイトフローメーターによる解析結果を示す図である。実施例1に従い、HLA-A24陽性健常人由来末梢血単核球からHLA-A24拘束性HCMV特異的CTLを誘導した後、実施例2に従って、HLA-A24拘束性HCMV特異的CTLの陽性率を測定した。陽性率10.28%と算定された。

【図2】 CD137モノクロナル抗体感作培養プレートによるHCMV特異的CTL単離例を示すためのサイトフローメーターによる解析結果を示す図である。実施例1で誘導したHLA-A24拘束性HCMV特異的CTLラインから【実施例3】1. に示した方法に従い、HLA-A24拘束性HCMV特異的CTLを単離した後、7日間培養した。単離前では10.28%であったHLA-A24拘束性HCMV特異的CTL陽性率が単離後、56.03%、さらに7日間培養後においては97.14%に上昇した。単離後の回収率は48.7%、7日間増殖後の増殖率は2.9倍であった。

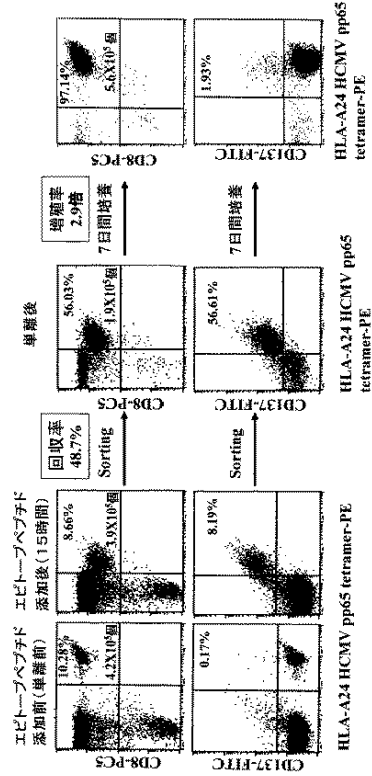
【図3】 細胞自動分離装置を用いた単離の結果を示すためのフローサイトメーターによる解析結果を示す図である。実施例1の方法で誘導したHLA-A24拘束性HCMV特異的CTLラインから【実施例3】2. に示した方法に従い、HLA-A24拘束性HCMV特異的CTLを単離した。純度についてはCD137を用いた方法とMHC-tetramerを用いた方法の間で差はみられなかったが、回収率の点ではCD137を用いた方法がMHC-tetramerを用いた方法に比べて優れていた。

【図4】 HCM特異的CTLの増殖の結果を示すためのフローサイトメーターによる解析結果を示す図である。【実施例3】1.の方法で単離したHLA-A24拘束性HCMV特異的CTLを【実施例4】に従い増殖させた。Tetramer/CD8陽性率は8日間増殖後において増殖前とほぼ同様であった。HCMV特異的CTL細胞数は、ほぼ10倍に増殖した。

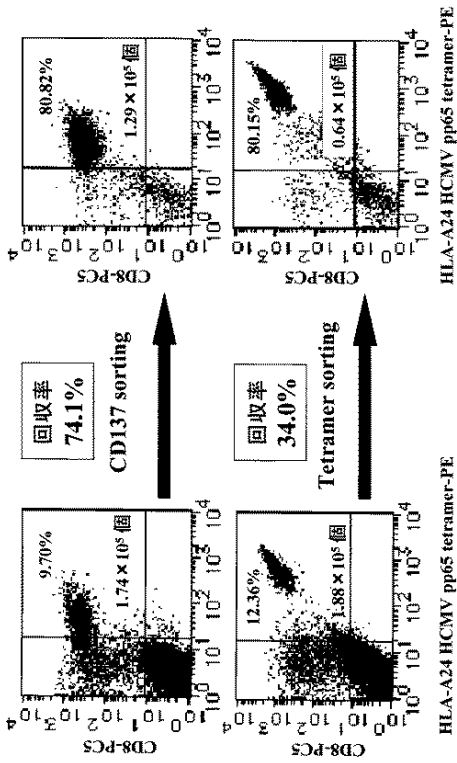
【図 1】



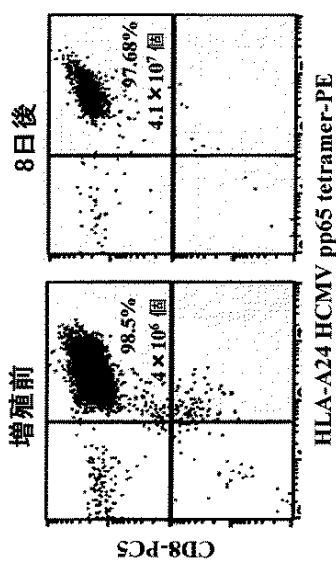
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【配列表】
2008023786000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2007/066439
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N5/06(2006.01)i, A61K35/14(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N5/06, A61K35/14, A61P31/12, C12Q1/02 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/ Y/ A	CELIS,E et al., Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Mar 15, vol.91(6), pp.2105-2109	1-3, 14, 18, 19/ 4-10, 15, 21/ 11-13, 16, 17
X/ Y/ A	OSTANKOVITCH,M et al., Generation of Melan-A/MART-1-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes from human naive precursors: helper effect requirement for efficient primary cytotoxic T lymphocyte induction in vitro. Int J Cancer. 1997 Sep 17, vol.72(6), pp.987-994	1-3, 14, 18, 19/ 4-10, 15, 21/ 11-13, 16, 17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 October, 2007 (24.10.07)		Date of mailing of the international search report 06 November, 2007 (06.11.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/066439

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/ A	SHUFORD, WW et al., 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. J Exp Med. 1997 Jul 7, vol.186(1), pp.47-55	4-10, 15, 18, 19, 21/ 1-3, 11-14, 16, 17
X/ A	TAN, JT et al., 4-1BB costimulation is required for protective anti-viral immunity after peptide vaccination. J Immunol. 2000 Mar 1, vol.164(5), pp.2320-2325	4-10, 15, 18, 19, 21/ 1-3, 11-14, 16, 17
A	HO, WY et al., In vitro methods for generating CD8+ T-cell clones for immunotherapy from the naive repertoire. J Immunol Methods. 2006 Mar 20, vol.310(1-2), pp.40-52	1-19, 21
A	FUJIE, Y et al., Induction of antitumor cytotoxic T lymphocytes from the peripheral blood mononuclear cells of cancer patients using HLA-A2-restricted MAGE-3 peptide in vitro. Clin Cancer Res. 1997 Dec, vol.3 (12 Pt 1), pp.2425-2430	1-19, 21
A	PLATTS, KE et al., Phenotypic and cell cycle analysis of human peripheral blood mononuclear cells activated with interleukin-2 and/or OKT3. Exp Cell Res. 1993 Sep, vol.208(1), pp.154-160	1-19, 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/066439

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 20 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1 (iv), to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 6 6 4 3 9													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/06(2006.01)i, A61K35/14(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i															
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/06, A61K35/14, A61P31/12, C12Q1/02															
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2007年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2007年	日本国実用新案登録公報	1996-2007年	日本国登録実用新案公報	1994-2007年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2007年														
日本国実用新案登録公報	1996-2007年														
日本国登録実用新案公報	1994-2007年														
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)															
C. 関連すると認められる文献															
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号													
X/ Y/ A	CELIS, E et al., Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Mar 15, vol. 91(6), pp. 2105-2109	1-3, 14, 18, 19 / 4-10, 15, 21/ 11-13, 16, 17													
X/ Y/ A	OSTANKOVITCH, M et al., Generation of Melan-A/MART-1-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes from human naive precursors: helper effect requirement for efficient primary cytotoxic T lymphocyte induction in vitro.	1-3, 14, 18, 19 / 4-10, 15, 21/ 11-13, 16, 17													
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</td> <td>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献														
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの														
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの														
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの														
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献														
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 24. 10. 2007		国際調査報告の発送日 06. 11. 2007													
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 長井 啓子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 9123												

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 6 6 4 3 9

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	Int J Cancer. 1997 Sep 17, vol.72(6), pp.987-994	
X/ A	SHUFORD, WW et al., 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. J Exp Med. 1997 Jul 7, vol.186(1), pp.47-55	4-10, 15, 18, 19, 21/ 1-3, 11-14, 16, 17
X/ A	TAN, JT et al., 4-1BB costimulation is required for protective anti-viral immunity after peptide vaccination. J Immunol. 2000 Mar 1, vol.164(5), pp.2320-2325	4-10, 15, 18, 19, 21/ 1-3, 11-14, 16, 17
A	HO, WY et al., In vitro methods for generating CD8+ T-cell clones for immunotherapy from the naive repertoire. J Immunol Methods. 2006 Mar 20, vol.310(1-2), pp.40-52	1-19, 21
A	FUJIE, Y et al., Induction of antitumor cytotoxic T lymphocytes from the peripheral blood mononuclear cells of cancer patients using HLA-A2-restricted MAGE-3 peptide in vitro. Clin Cancer Res. 1997 Dec, vol.3(12 Pt 1), pp.2425-2430	1-19, 21
A	PLATTS, KE et al., Phenotypic and cell cycle analysis of human peripheral blood mononuclear cells activated with interleukin-2 and/or OKT3. Exp Cell Res. 1993 Sep, vol.208(1), pp.154-160	1-19, 21

国際調査報告	国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 6 6 4 3 9
<p>第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)</p> <p>法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲 20 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲20は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。</p>	
<p>第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)</p> <p>次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。</p> <p>1. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。</p> <p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。</p>	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	K	
		G 0 1 N 33/53	D	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 渡邊 一絵
日本国愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友商事丸の内ビル5F 株式会社医学生物学研究所内

(72)発明者 田路 真悟
日本国愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友商事丸の内ビル5F 株式会社医学生物学研究所内

(72)発明者 金 律子
日本国愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友商事丸の内ビル5F 株式会社医学生物学研究所内

(72)発明者 赤塚 美樹
日本国愛知県名古屋市千種区鹿子殿1番1号 愛知県がんセンター研究所内

(72)発明者 高橋 利忠
日本国愛知県名古屋市千種区鹿子殿1番1号 愛知県がんセンター研究所内

(72)発明者 葛島 清隆
日本国愛知県名古屋市千種区鹿子殿1番1号 愛知県がんセンター研究所内

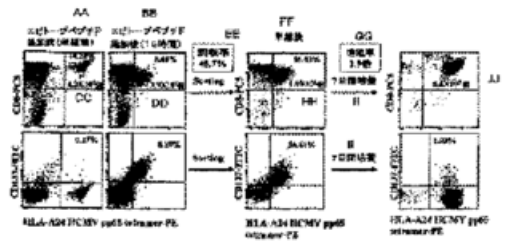
Fターム(参考) 4B063 QA07 QQ03 QQ08 QR48 QR77 QS40 QX01
4B065 AA93X AC20 BA30 BB19 BC12 BC50 BD14 CA44 CA46
4C087 AA01 BB37 DA31 NA14 ZB33

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	产生病毒特异性CTL的方法		
公开(公告)号	JPWO2008023786A1	公开(公告)日	2010-01-14
申请号	JP2008530963	申请日	2007-08-24
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社医学生物学研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社医学生物学研究所 爱知県		
[标]发明人	鈴木進 渡邊一絵 田路真悟 金律子 赤塚美樹 高橋利忠 葛島清隆		
发明人	鈴木 進 渡邊 一絵 田路 真悟 金 律子 赤塚 美樹 高橋 利忠 葛島 清隆		
IPC分类号	C12N5/07 C12Q1/02 A61P31/12 A61K35/14 G01N33/553 G01N33/53 A61K35/17 C12N5/078 C12N5/0783		
CPC分类号	A61K35/12 A61K39/12 A61K39/245 A61K2039/5154 A61K2039/5158 C07K14/005 C12N5/0636 C12N2710/16122 C12N2710/16134 C12Q1/02		
FI分类号	C12N5/00.E C12Q1/02 A61P31/12 A61K35/14.Z G01N33/553 G01N33/53.K G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B063/QA07 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS40 4B063/QX01 4B065/AA93X 4B065/AC20 4B065/BA30 4B065/BB19 4B065/BC12 4B065/BC50 4B065/BD14 4B065/CA44 4B065/CA46 4C087/AA01 4C087/BB37 4C087/DA31 4C087/NA14 4C087/ZB33		
代理人(译)	小林洋平		
优先权	2006228525 2006-08-25 JP		
其他公开文献	JP5433825B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种简单且安全且可以低成本实施的病毒特异性CTL封闭型培养系统，以实现使用病毒特异性（HCMV特异性）CTL的细胞疗法的实际应用。那个 SOLUTION：将病毒特异性CTL表位肽和外周血单核细胞混合并培养，并在培养基中用该抗原表位肽再刺激后，将病毒特异性CTL靶向新表达的CD137抗原。分别地，通过用OKT3（抗CD3单克隆抗体）刺激从外周血单核细胞生长的T细胞和表位肽在培养基中接触，然后将T细胞和病毒特异性CTL共培养。这样，特定于病毒的CTL就会增长。[选择图] 2



- A. BEFORE ADDITION OF EPITOPE PEPTIDE (BEFORE ISOLATION)
- B. AFTER ADDITION OF EPITOPE PEPTIDE (16 HOURS)
- C. 4.2×10^5 CELLS
- D. 3.0×10^6 CELLS
- E. RECOVERY RATE 46.7%
- FF AFTER ISOLATION
- GG PROLIFERATION RATIO: 2.5 TIMES
- HH 1.8×10^5 CELLS
- II 7 DAY CULTURE
- JJ 6.6×10^6 CELLS