



Title	Hollow fiber bioreactor system を用いたLAK (lymphokine activated killer) 細胞の大量培養法の検討および静置培養法との比較
Author(s)	田中, 利茂
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37131">https://hdl.handle.net/11094/37131</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	た 田	なか 中	とし 利	しげ 茂
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	第	9 1 1 6	号	
学位授与の日付	平 成	2 年	3 月	24 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻 学位規則第 5 条第 1 項該当			
学 位 論 文 題 目	Hollow fiber bioreactor system を用いた LAK (lymphokine activated killer) 細胞の大量培養法の検討および静置培養法との比較			
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授	田 口 鐵 男		
	(副査) 教 授	岸 本 進	教 授	森 武 貞

## 論 文 内 容 の 要 旨

### (目 的)

末梢血リンパ球を Interleukin-2 (IL-2) と共に培養して得られる Lymphokine activated killer (LAK) 細胞を用いた悪性腫瘍の養子免疫療法の臨床研究が多く施設で行われているが, Rosenbergらによれば1回の治療に必要な細胞数は $10^{10-11}$ 個と大量で, LAK 細胞の大量培養システムの確立が必要である。今回, hollow fiber bioreactor system (Acusyst-P<sup>®</sup>, Endotronics 社) を用いて LAK 細胞の大量培養を行い, 誘導される LAK 細胞について細胞障害性と phenotype の面から解析し, 従来用いている静置培養システム〔プラスチック培養ケース (NUNC LON<sup>®</sup>, Nunc 社) およびガス透過性バッグ (Lifecell<sup>®</sup>, Baxter 社)〕と比較検討した。

### (材料と方法)

健常人または担癌患者の末梢血より, cell separator および Ficoll-paque を用いた比重遠沈法にて単核球を分離し, 各培養システムを用い LAK 細胞を誘導した。細胞障害性試験は Daudi 細胞, Raji 細胞, K562 細胞を標的細胞として, 4 時間  $^{51}\text{Cr}$  release assay にて測定した。Phenotype の解析は Leu 4 (CD3) - Leu 19 (CD56), Leu 4-HLA DR, Leu 3a (CD4) - Leu 2a (CD8), Leu 7 (CD57) - Leu 11c (CD16) の組合せで, FITC および PE を用いた二重染色法にて測定した。また, cell sorting には Leu 4-FITC と Leu 19-PE を用いた二重染色法で, cell sorter (FACS tar) を用いて細胞を分離した。

### (結 果)

1. Hollow fiber bioreactor system による大量培養では3週間で $21 \pm 5.0$ 倍, cartridge 1本あたり平均約 $2.1 \times 10^{10}$ 個のLAK細胞を培養することができ, 細胞生存率も90%以上であった。細胞障害性は Daudi細胞とK562細胞に対しては低いE/T ratioでも高い細胞障害性を示したがRaji細胞に対してはE/T ratioが20/1で $42.6 \pm 7.6\%$ と比較的低値を示した。Phenotype では $\text{Leu4}^+\text{HLA DR}^+$ 細胞:  $81.10 \pm 3.52\%$ ,  $\text{Leu3a}^-\text{Leu2a}^+$ 細胞:  $75.28 \pm 11.19\%$ および,  $\text{Leu7}^+\text{Leu11c}^-$ 細胞:  $64.20 \pm 8.80\%$ と高率で,  $\text{Leu4}^+\text{Leu19}^+$ 細胞が $42.43 \pm 3.94\%$ と $\text{Leu4}^+$ 細胞の約半数を占めるのが特徴的であった。また, 細胞障害性の継続的な上昇は $\text{Leu4}^+\text{Leu19}^+$ 細胞および $\text{Leu4}^+\text{HLA DR}^+$ 細胞の増加に平行することが観察された。

2. 細胞増殖率は静置培養システムでは低値を示した。また, 細胞障害性は, hollow fiber bioreactor systemでは, 静置培養システムに比べRaji細胞に対する細胞障害性が低値を示した。

Phenotypeについて, Lifecell®とNuncion®の2つの静置培養システムでは $\text{Leu4}^-\text{Leu19}^+$ ,  $\text{Leu7}^-\text{Leu11c}^+$ の解析では差はなく,  $\text{Leu4}^-\text{Leu19}^+$ 細胞, および $\text{Leu7}^-\text{Leu11c}^+$ 細胞の出現が特徴的であった。一方, hollow fiber bioreactor systemでは, 逆に $\text{Leu4}^+$ 細胞特に $\text{Leu4}^+\text{Leu19}^+$ 細胞や $\text{Leu7}^+\text{Leu11c}^-$ 細胞の増加が特徴的であった。

3.  $\text{Leu4}^-\text{Leu19}^+$ 細胞の方が $\text{Leu4}^+$ 細胞に比べRaji細胞に対する細胞障害性は高値を示した。また,  $\text{Leu4}^+\text{Leu19}^+$ 細胞の方が $\text{Leu4}^+\text{Leu19}^-$ 細胞に比べ細胞障害性は高値を示した。

### (総 括)

LAK細胞の大量培養を行う場合, 静置培養システムでは培地供給を十分に行えば細胞密度が低下しそれに伴い細胞増殖率も低下するため, 治療に十分な細胞数を得るのに十分な培養環境とはいえない。これに対し, hollow fiber bioreactor systemは最適な培養条件を維持することができ, 細胞増殖率は3週で $21 \pm 5.0$ 倍で1本のbioreactor cartridgeあたり $10^{10}$ 個単位のLAK細胞の培養が可能であり, 必要な培養スペースも最小限であった。また, 誘導されるLAK細胞は, 静置培養システムでは $\text{Leu4}^-\text{Leu19}^+$ ,  $\text{Leu7}^-\text{Leu11c}^+$ のNK-LAK細胞の誘導が優位であるのに対し, hollow fiber bioreactor systemでは $\text{Leu4}^+\text{T-LAK}$ 細胞が主体で, そのうち抗腫瘍性の高い $\text{Leu4}^+\text{Leu19}^+$ 細胞を高率に誘導することが可能で, 悪性腫瘍の養子免疫療法に有効であることが示唆された。

## 論文の審査結果の要旨

LAK細胞を用いた悪性腫瘍の養子免疫療法を行う場合, 大量培養法の開発が必要である。本研究は, hollow fiber bioreactor systemを利用し, 大量培養が可能であることを明らかに

した。また、同時に静置培養法と比較し、これら培養法の違いによるLAK細胞の細胞増殖率、細胞障害性および, phenotypeの変化について明らかにしたものであり、養子免疫療法とくにリンパ球大量培養法に関して種々の新知見をもたらした。