

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4863620号  
(P4863620)

(45) 発行日 平成24年1月25日(2012.1.25)

(24) 登録日 平成23年11月18日(2011.11.18)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 35/14	(2006.01)
A 61 P 7/06	(2006.01)
A 61 P 7/00	(2006.01)
C 12 N 5/0786	(2010.01)
C 12 N 5/02	(2006.01)
A 61 K 35/14	Z
A 61 P 7/06	
A 61 P 7/00	
C 12 N 5/00	202 N
C 12 N 5/02	

請求項の数 6 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2004-562241 (P2004-562241)
(86) (22) 出願日	平成15年5月7日(2003.5.7)
(65) 公表番号	特表2006-514034 (P2006-514034A)
(43) 公表日	平成18年4月27日(2006.4.27)
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/014336
(87) 国際公開番号	W02004/056397
(87) 国際公開日	平成16年7月8日(2004.7.8)
審査請求日	平成18年4月28日(2006.4.28)
(31) 優先権主張番号	10/159, 148
(32) 優先日	平成14年5月29日(2002.5.29)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	504436136 ヤング, デマオ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 043, マウンテン ビュ, スイート 16, ロック ストリート 1921番地
(74) 代理人	100083932 弁理士 廣江 武典
(74) 代理人	100121429 弁理士 宇野 健一
(74) 代理人	100129698 弁理士 武川 隆宣
(74) 代理人	100129676 弁理士 ▲高▼荒 新一
(74) 代理人	100130074 弁理士 中村 繁元

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抹消血単核細胞の培養方法及び該細胞を用いた薬剤組成物

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

生体外で末梢血単核細胞を培養する方法であって、  
インターロイキン-2、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子およびイオノフォアの存在下で免疫細胞を含む末梢血単核細胞を培養するステップを含み、抗原とは無関係に活性化される活性化免疫細胞を含んだ活性化末梢血単核細胞を形成することを特徴とする末梢血単核細胞の培養方法。

## 【請求項 2】

末梢血単核細胞は培養に先立って血清から少なくとも部分的に分離されることを特徴とする請求項1記載の末梢血単核細胞の培養方法。

10

## 【請求項 3】

請求項1又は2のいずれかに記載の培養方法で培養された末梢血単核細胞を有効成分とする再生不良性貧血症又は血小板減少性紫斑病の治療のための薬剤組成物。

## 【請求項 4】

末梢血単核細胞は患者自身のものであることを特徴とする請求項3記載の薬剤組成物。

## 【請求項 5】

末梢血単核細胞は患者と同種のものであることを特徴とする請求項3記載の薬剤組成物。

## 【請求項 6】

患者への注射により投与されることを特徴とする請求項3～5のいずれかに記載の薬剤

20

組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は再生不良性貧血、貧血および血小板減少性紫斑病の治療法に係り、特に、体外培養した活性化血球細胞を利用した再生不良性貧血、貧血および血小板減少性紫斑病の治療法に関する。さらに、本発明は細胞を活性化する方法および相応な細胞培養の方法に関する。

【背景技術】

【0002】

再生不良性貧血は造血機能の低下によって生じる病気である。患者のすべての血球細胞の再生機能には程度の違う異常が発生する。多くの場合は、この病気の病因は解明できないが、輻射、ベンジン化合物、ウィルス（肝炎ウィルスなど）、環境毒素、大衆薬や処方薬などが骨髄を損害し、しだいに骨髄幹細胞のプログラム細胞死（apoptosis）に導くことはこの病気の原因であると思われる。しかし、病因はともかく、患者にはみんな似たような臨床症状と進行が見られる。再生不良性貧血は、男女問わず、主に若い方と年を取った方によく発生する病気である。毎年、全世界において、百万人の内に約2~6人がこの病気にかかるが、その内でもヨーロッパ人とアメリカ人よりも、東洋人の方が多い。この病気の病原因子は、一般に先天的な原因、妊娠、ウィルス、および薬と化学品が挙げられる。

10

【0003】

上記再生不良性貧血の病原因子の内、一番良く知られたのは薬と化学品への曝露である。クロラムフェニコール、ベンジン、イオン化輻射および抗癌薬などの病原因子は使用量または暴露量により再生不良を起こすが、その嚴重さは人により違う、また、病原因子を排除すると一般に骨髄も通常状態に戻る。しかし、殺虫剤、一部の鎮痙剤、抗生物質のような病原因子の場合は、使用量に関係しない反応を起こすことができるから、投与時に血液検査を通してその反応を予測することができない。時には投与を停止した後に再生不良が発生することもある。先天的な再生不良性貧血の患者と違って、薬や毒素によって発生した再生不良性貧血の患者は、ほぼ同じ臨床特徴、人口統計特徴および予後があり、また、治療に対してもほぼ同じ反応を示す。

20

【0004】

ベンジン誘発の再生性貧血は、軽症の場合は、ベンジンへの曝露を排除すれば症状は消えるが、重症あるいは継続的に輸血が必要な場合は、未だに有効なしかも安全な治療法がない。現在では、骨髄移植にたよる他ない。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

一般に、軽症再生性貧血患者に対しては、できるだけ治療を施さず、病原因子を排除し、自然治癒を目指すのは原則である。しかし、若い重症再生性貧血患者の場合は、HLAが合ったドナーから骨髄を移植するしか治療方法がない。骨髄移植の治癒率は約80%くらいあるが、ドナーと患者の遺伝子座が二個以上合わない場合は、生存率が10~20%まで落ちる。また、骨髄移植を受けた患者には、移植片拒否反応、急性あるいは慢性移植片対宿主病、感染およびその他の器官特異性損害などの合併症が見られるの他に、長期的に固形癌になるリスクもかなり高い。

40

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の発明者は培養した（活性化した）血球細胞を用いて貧血、再生不良性貧血、血小板減少性紫斑病などの貧血症を治療することについて研究を行った。本発明の一つの実施例では、患者に対して有効な量の血球細胞を注射することにより貧血症を治療する。使用した血球細胞はサイトカインおよびイオノフォアが存在する条件下で培養しても良い。

50

サイトカインおよびイオノフォアは有効な濃度を有しても良い。サイトカインはインターロイキン-2及びマクロファージコロニー刺激因子を含有しても良い。そして、イオノフォアはA23187を含有しても良い。

#### 【0007】

本発明の他の実施例では、体外培養した血球細胞を患者に投与することにより貧血症を治療する方法が提案された。使用した血球細胞は治療に有効な量のものであっても良い。使用した血球細胞は患者自体のものか、患者自体の血球細胞と同種のものか、または免疫の角度から見れば受入れができるものであっても良い。さらに、使用した血球細胞は有効な量を有するサイトカインおよびイオノフォアが存在する条件下で培養したものであっても良い。

10

#### 【0008】

本発明のもう一つの実施例では、サイトカインおよびイオノフォアが存在する条件下で血球細胞を培養する方法が提案された。例として、上記血球細胞は有効な量のサイトカインおよびイオノフォアが存在する条件下で培養したものであるか、哺乳類動物の血清を含むまたは含まない培地で培養したものであるか、2~200時間またはそれ以上の時間で培養したものであるか、あるいは30~42またはその他の温度条件で培養したものであっても良い。上記サイトカインはインターロイキン-2及び(または)顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子を含有するものであっても良い。そして、上記イオノフォアはA23187を含有するものであっても良い。

20

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0009】

本発明は治療に有効な量の体外培養血球細胞を患者に投与することにより貧血、再生不良性貧血、血小板減少性紫斑病などの貧血症を治療する方法に関する。上記「治療に有効な量」とは貧血症患者に対し、十分な量の上記活性化血球細胞を提供することにより、その血液細胞数を著しく高めることを意味し、言い換えれば、赤血球、白血球、血小板など患者の骨髄が作った因子や細胞(血液の自然な成分)の濃度は非常に低くなることである。培養に使う血球細胞は患者自身のものか、あるいは免疫の角度から見れば受入れができることができるドナーからのものであっても良い。体外培養の一つの方法は、まず患者または免疫の角度から見れば受入れができるドナーから血液サンプル(例えば10~100ml)を取り、それからその血液サンプルを分離し、血球細胞を得てから培養する。上記「免疫の角度から見れば受入れができるドナー」とは、ドナーの血球細胞を含む組織は、受容体側に対し医療上認めることができない反応(例えば溶血性貧血、心不全、腎不全など)を起こしてはならないとの意味である。上記血球細胞は遠心分離などの方法で血清から分離される。分離された血球細胞は、滅菌条件下でサイトカイン(あるいは細胞刺激因子)またはイオノフォア、あるいは両者を共に含む培地を利用して培養する。上記分離された血球細胞の培養時間及び培養温度は、例として一時間以内、一時間以上、その他の実施例では10~200時間、20~80時間、または30~60時間が上げられ、培養温度については、30~42、32~40、または37~38などが挙げられるが、これらの明確に指定した範囲内のすべての時間と温度は、本開示が請求した時間と温度となることは、特許領域の常識だと思うので、ここでは贅言しないとする。

30

#### 【0010】

貧血症は上記方法で治療できる。一般に、貧血症は血液中に骨髄の産物である血液成分(細胞など)の濃度が低いことにより生じた病気であり、貧血(anemia)、再生不良性貧血(aplastic anemia)、血小板減少性紫斑病(thrombocytopenic purpura)などに分けられる。貧血(anemia)とは、血液成分の欠如と考えて良いが、場合によって、赤血球の欠如に限定される。再生不良性貧血は周辺血液成分の欠如である。血小板減少性紫斑病(例えば先天性血小板減少性紫斑病)とは血小板の数量が少ないとのことである。以下例を挙げて再生不良性貧血の治療について詳しく説明するが、もちろんこの治療法は他の貧血症にも適用できる。

40

#### 【0011】

50

培養した活性化血球細胞を洗浄し（例えば、滅菌生理塩水で二回洗浄する）、治療に有効な量を患者に与えた。投与の方法は、静脈内注射を良い方法の一つとして勧める。一回で投与しても良いが、一定の期間において何回に分けて投与しても良い。例えば、上記活性化血球細胞を一週間一回、合計四週間投与するか、一週間二回、十日間おきに、14日間おきに、21日間おきにあるいは他の間隔と期間で投与しても良い。また、治療中に投与間隔を変更しても良い。例えば、上記血球細胞の最初投与間隔を一日一回、一週間二回、一週間一回または二週間一回などにする。毎回治療の投与量は、患者の年齢と状況によって、例えば $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^8$ にすると良い。治療期間は（上記活性化血球細胞を投与する場合）、活性化血球細胞の供給量と患者の反応によって決まる。患者の反応は、例えば血球細胞数が正常レベルに戻った、骨髄の組織学構造が正常になった、あるいは体全体の具合が改善されたなどで判断できる。言うまでなく、最初治療中にまたはその後に患者から血液サンプルを採り、後の治療のために活性化血球細胞を培養することもできる。さらに、最初治療または全部の治療に使用する活性化血球細胞は、免疫の角度から見れば受入れることができるドナーからの血液サンプルで培養したものであっても良い。また、治療の最初段階に免疫の角度から見れば受入れることができるドナーからの血液サンプルで培養した活性化血球細胞を投与し、それから患者自体の血液サンプルを採り、それで活性化血球細胞を培養し、患者に投与しても良い。

#### 【0012】

最新の定義によれば、重症再生不良性貧血症とは下記三つの条件の内に二つ以上を満たす汎血球減少症（pancytopenia）である。1) 顆粒球数は500/ミクロリットル以下。2) 血小板数は20,000/ミクロリットル以下。3) 網赤血球の換算後カウント数1%未満、造血細胞が著しく少ない低形成骨髄を特徴とする貧血症。軽症（中症）再生不良性貧血は、一般に骨髄の低形成は見られるが、少なくとも二種類の細胞の減少はひどい状態になっていない。この種の貧血症の進行は潜在的なものであり、最初の内にただ貧血による疲れが感じられ、そして場合により、出血も見られる。出血はよく皮膚あるいは粘膜の裏層にあり、血小板の減少によるものだと考えられる。好中球は著しく減少するが、感染がほとんどない。患者に対して身体検査すると、よく蒼白、紫斑や点状出血が見られる。再生不良性貧血の患者はリンパ腺腫または脾腫がなく、時には発熱の症状があるが、発熱しない患者もいる。末梢血液検査をすると汎血球減少が見られる。一般に未成熟の赤血球または白血球が存在すれば、もう再生不良性貧血症ではないとほとんど判断できる。

#### 【0013】

増加しづつ赤血球の生成圧力が存在するため、赤血球は多少大きくなるが、正球性正色素性なものである。網赤血球の補正カウント数は非常に低く（ゼロになる場合もある）、赤血球が形成されないことを示す。血液の凝固指標は通常であっても、出血時間が長い。患者の血清の鉄含有量は高くなり、鉄輸送蛋白質（トランスフェリン）は正常であり、その結果としてトランスフェリン飽和度は高くなる。赤血球の生成が減少したため、血漿の鉄排出量は減る。骨髄穿刺をすると、たいがい骨髄が乾燥していることが分かる。生体組織検査ではひどい細胞減少または脂肪分に置換された再生不良性骨髄が見られる。最初の生体組織検査で細胞の過形成が見られるケースがあるので、正しい診断を得るために、何回生体組織検査を行う必要がある。骨髄系、赤芽球系、多能性系および巨核球系の造血前駆細胞がすべてひどく減少する。診断は、貧血、好中球の減少および血小板の減少この三つの条件にたよる。また、骨損傷と腫瘍性浸潤を除外するために、X線検査も行う必要がある。磁気共鳴イメージングを利用すると低形成骨髄を明確に判断することができる。再生不良性貧血は除外法で診断する病気であり、正しい診断を下す前に汎細胞減少など他の疾患を実験で除外しなければならない。

#### 【0014】

基本的に再生不良性貧血とは各種細胞の生成不能である。そのメカニズムおよび病因は下記の四つにあると考えられる。1)造血幹細胞の欠陥または欠如。2)骨髄マイクロ環境の異常。3)「調節細胞」（regulatory cell）の異常。4)免疫細胞により造血機能の低下。

#### 【0015】

10

20

30

40

50

再生不良性貧血の病理は未だに完全に解明できていないが ( Youngら : The pathophysiology of acquired aplastic anemia ( 後天性再生不良性貧血の病理 ), N. Engl. J. Med. 1997; 336(19): 1365-1372 および Young ら : The

treatment of severe acquired aplastic anemia ( 後天性再生不良性貧血の治療 ), Blood 1995; 85(12): 3367-337 ) 、免疫性疾患であることは研究により証明された。治療に当たっては、骨髄移植および抗リンパ球グロブリンとシクロスボリンを併用した免疫抑制法が採用された ( Rosenfeldら : Intensive

immunosuppression with antithymocyte globulin and cyclosporine as treatment for severe aplastic anemia ( 抗胸腺細胞グロブリンおよびシクロスボリンの強い免疫抑制作用による重症再生不良性貧血の治療 ), Blood 1995; 85(11): 3058-3065 10 、 Halperinら : Severe acquired aplastic anemia in

children: 11 -year experience with bone marrow transplantation and immunosuppressive therapy ( 骨髄移植および免疫抑制療法において11年の経験から見た子供の重症再生不良性貧血 ), Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol. 1989; 11(3): 304-309 ) 。しかし、免疫抑制療法はしばしば嚴重な副作用を起こす。また、顆粒球コロニー刺激因子 ( 小島ら : Treatment of aplastic anemia in children with recombinant human granulocyte-colony stimulating factor ( ヒト組み換え顆粒球コロニー刺激因子による子供の再生不良性貧血の治療 ), Blood 1991; 77(5): 937-941 、 Sonodaら : Multilineage response in

aplastic anemia patients following long-term administration of filgrastim ( 長期間フィルグラストム ( ヒト組み換え顆粒球コロニー刺激因子 ) 投与後の再生不良性貧血患者のMultilineage反応 ), Stem Cells 1993; 11: 543-554 ) 、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 ( Champlin ら : Treatment of refractory aplastic anemia with recombinant human granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor ( ヒト組み換え顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子による不応性再生不良性貧血の治療 ), Blood 1989; 73(3): 694-699,

Guinan ら : A phase I/II trial of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for children with aplastic anemia ( 組み換え顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子による子供再生不良性貧血に対するI/II段階実験 ), Blood 1990; 76(6): 1077-1082 ) およびインター-ロイキン-3 ( 30

Ganser ら : Effect of recombinant human interleukin-3 in patients with normal hematopoiesis and in patients with bone marrow failure ( 組み換えヒトインター-ロイキン-3が一般造血機能不全患者および骨髄不全患者に対する効果 ), Blood 1990; 76(4): 66-676 。 Nimer ら : A phase I/II study of

interleukin-3 in patients with aplastic anemia and myelodysplasia ( 再生不良性貧血患者および骨髄異形性症候群患者に対するI/II段階研究 ), Exp. Hematol. 1994; 22: 875-880 ) などの造血因子の効果には限度があり、しかも一時的なものに過ぎない。

#### 【 0 0 1 6 】

多くの患者は免疫抑制療法に対し反応を示し、また、再生不良性貧血症の患者の場合は、異常な量の免疫分子が見られた。例として、マクロファージ、ナチュナルキラー細胞、Bリンパ球および内皮細胞が作るインター-ロイキン-1が挙げられる。このインター-ロイキン-1は骨髄間質細胞に働きをかけ、单分化能赤芽球および多分化能コロニー刺激因子の生成を誘導し、誘導発生した骨髄抑制に対し、早期前駆細胞および刺激幹細胞を回復させる効果があるため、免疫反応および造血機能の調整に重要な役割を果たしている。再生不良性貧血症に伴う免疫制御障害は、ナチュラルキラー細胞の活動の低下、活性化抑制性T細胞数量の増加、およびインター-ロイキン-2とガンマ-インターフェロンの異常発生などの特徴が見られる。

#### 【 0 0 1 7 】

ナチュラルキラー細胞は大顆粒リンパ球であり、腫瘍細胞およびウィルスにより感染さ 50

れた標的細胞と直接接觸する時にこれらの細胞を溶解できる。また、ナチュラルキラー細胞はガンマ-インターフェロンおよびインターロイキン-2を生成でき、コロニー刺激作用を誘発させる働きもある。特定な条件において、これらの細胞は骨髄系および赤芽球系のコロニーの形成を抑制できる。例えば、培養物に外来性の成長因子が存在しない場合に、ナチュラルキラー細胞は一般にサイトカインを作り、造血作用をサポートする。しかし、最適な条件が揃えた場合に、ナチュラルキラー細胞は造血作用を抑制する。再生不良性貧血患者の造血機能が回復された後にナチュラルキラー細胞の活動は正常状態に戻る。

## 【0018】

ガンマ-インターフェロンは活性化リンパ球により生成され、造血を抑制する働きがある。再生不良性貧血患者の場合にガンマ-インターフェロンの過生成が見られるが、免疫制御を受けるとそのレベルは低下する。インターフェロンは直接にまたは付属免疫系細胞を通して間接に前駆細胞に動きかけ、造血コロニーの形成を強く抑制する働きがある。

10

## 【0019】

再生不良性貧血患者に過剰生成しているサイトカインのもう一つは腫瘍壊死因子-アルファ (Tumor necrosis factor-alpha) であり、正常造血前駆細胞のコロニー成長を抑制する機能がある。腫瘍壊死因子-アルファの量が多ければ、血小板、ヘモグロビンおよび白血球のカウント数は少なくなる。腫瘍壊死因子-アルファとガンマ-インターフェロンの相乗効果で造血機能が抑制される。

## 【0020】

再生不良性貧血患者にはガンマ-インターフェロンと腫瘍壊死因子-アルファの過剰生成が見られるの他に、ヘルパー-抑制性T細胞比も逆になり、骨髄には非常に多量の抑制性T細胞が生成されている。これらの細胞はサイトカインの生成を通して造血の抑制効果を軽減させることができる。また、患者の骨髄の細胞障害T細胞の比例も、末梢血液より遙かに高い。免疫抑制治療を行った後に活性化リンパ球が減少することから見れば、再生不良性貧血症は免疫機能の障害と関連付けられる。

20

## 【0021】

後天性再生不良性貧血、特にベンジン誘導の再生不良性貧血のメカニズムはまだ解明されていない。が、すべての再生不良性貧血には病態生理学上および臨床上の類似性がたくさん見られる。現在では、再生不良性貧血のメカニズムについて主に二つの仮説、即ち直接損害説と免疫参与説があり、共に実験データおよび臨床研究により実証された。直接損害は細胞障害性化学療法および放射線療法を受けた患者の一時的な、可逆的な骨髄不全の原因と考えられる。免疫参与の骨髄不全は非常に治療が難しいものである。ベンジン誘導の再生不良性貧血は上記二つのメカニズムによるものと思われる。ベンジンは骨髄細胞のいくつかの生化学プロセス、特に骨髄の間質マクロファージを損害し、インターロイキン-1の生成を抑制できることは研究により実証された (Niculescu ら : Inhibition of the conversion of pre-interleukins-1[alpha] and 1[beta] to mature cytokines by p-benzoquinone, a metabolite of benzene (ベンジン代謝物の一種であるp-による前インターロイキン-1 (アルファ) および前インターロイキン-1 (ベータ) の成熟サイトカインへの変換に対する抑制効果), Chemico-Biological Interactions; 1995; 98: 211-222、Kalf ら :

30

p-benzoquinone, a reactive metabolite of benzene, prevents the processing of pre-interleukins-1[alpha] and -1 [beta] to active cytokines by inhibition of the processing enzymes, calpain, and interleukin-1 [beta] converting enzyme (ベンジン代謝物の一種であるp-のプロセシング酵素、およびインターロイキン-1 (ベータ) 変換酵素を抑制することにより前インターロイキン-1 (アルファ) および前インターロイキン-1 (ベータ) の活性化サイトカインへの変換に対する抑制効果), Environmental Health Perspectives; 1996; 104 (suppl. 6): 1251-1256)。インターロイキン-1は幹細胞が成長および分化する上に重要なものである (Bagby, G. C. : Production of multi lineage growth factors by hematopoietic stromal cells: an intercellular regulatory network

40

50

involving mononuclear phagocytes and interleukin-1 (造血間質細胞による多系列成長因子の生成 : 単核食細胞およびインターロイキン-1を含む細胞間制御ネットワーク), Blood Cells 1987; 13:147-159. Fibbeら : Human fibroblasts produce granulocyte-CSF, macrophage-CSF and granulocyte-macrophage-CSF following stimulation by interleukin-1 and poly(r1).poly(rC) (インターロイキン-1、poly(r1)およびpoly(rC)の刺激によるヒトの顆粒球-CSF、マクロファージ-CSFおよび顆粒球-マクロファージ-CSFの生成), Blood 1988; 72(3): 860-866)。しかし、今までにインターロイキン-1などの造血成長因子を用いた治療に対する長期反応に関する報告は一切なかった。

## 【0022】

10

## 培地

理想的な体外培養用の培地には、一般に、無機塩、アミノ酸、ビタミンなど血球細胞が直接に利用できる必要な栄養分がたくさん含まなければならない。このような培地の例としてRPMI 1640が挙げられるが、その他の培地、例えば無血清培地AIM-Vも血球細胞を支えることができるので、培養に使ってもかまわない。培地の他に、哺乳類の血清（例えば牛胎児血清）を重量比0.1～50%、1～40%、5～15%などの量で培地に添加しても良い。American Type Culture Collectionのカタログ（30-2001）に載っている改良RPMIであるRPMI 1640は下記の成分を含む：

1. Inorganic Salts (g/liter) Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.2.4H<sub>2</sub>O 0.10000 MgSO<sub>4</sub> (anhydrous) 0.04884 KCl 0.40000 NaHCO<sub>3</sub> 1.50000 NaCl 6.00000 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhydrous) 0.80000 Amino Acids (g/liter) L-Arginine (free base) 0.20000 L-Asparagine.H<sub>2</sub>O 0.05682 L-Aspartic Acid 0.02000 L-Cystine.2HCl 0.06520 L-Glutamic Acid 0.02000 L-Glutamine 0.30000

20

Glycine 0.01000 L-Histidine (free base) 0.01500 Hydroxy-L-Proline 0.02000 L-Isoleucine 0.05000 L-Leucine 0.05000 L-Lysine.HCl 0.04000 L-Methionine 0.01500 L-Phenylalanine 0.01500 L-Proline 0.02000 L-Serine 0.03000 L-Threonine 0.02000 L-Tryptophan 0.00500 L-Tyrosine.2Na.2H<sub>2</sub>O 0.02883 L-Valine 0.02000 Vitamins (g/liter) D-Biotin 0.00020 Choline Chloride 0.00300 Folic Acid 0.00100 myo-Inositol 0.03500 Nicotinamide 0.00100 p-Amino Benzoic Acid 0.00100 D-Pantothenic Acid 0.00025 (hemicalcium) Pyridoxine.HCl 0.00100 Riboflavin 0.0020 Thiamine.HCl 0.00100

30

Vitamin B-12 0.000005 Other (g/liter) D-Glucose 4.50000 Glutathione (reduced) 0.00100 HEPES 2.38300 Phenol Red, Sodium Salt 0.00500 Sodium Pyruvate 0.11000

1. サイトカイン：本発明に関わる活性化血球細胞を培養する時に一種類または多種類のサイトカインを使用できる。サイトカインは細胞由来の小分子量たんぱく質（分子量5-20kD）であり、細胞間相互作用、細胞間コミュニケーションおよび他の細胞の活動に対し特別な効果がある。サイトカインは、インターロイキン、シグナル伝達分子（腫瘍壊死因子）およびインターフェロンに分けられる。本発明においては自然サイトカインの他に、例えば核酸発現システムを利用して作った組み換えサイトカイン、または自然サイトカインの機能を有する自然サイトカインの改良型、変異型の使用も可能である。以下に、本発明の実施例に使用できるサイトカインのいくつかを説明する。

40

## 【0023】

A.インターロイキン：インターロイキンは自然に少量発生したポリペプチドであり、特定な細胞の機能を影響できる。インターロイキンはリンパ球、単核細胞およびその他の細胞が作った調節たんぱく質により分泌され、抗原性刺激および非抗原性刺激を受けた時に放出される。現在では、合計16種類のインターロイキンが確認された。インターロイキンは、リンパ細胞およびその他の細胞の成長性、活動性や分化を調整することにより炎症反応および免疫反応を調節する。本発明においては、濃度10～50,000IU/ml、100～5,000 IU/ml、100～1,000 IU/mlまたはその他の有効な濃度を有するインターロイキンが使用され

50

る。ここで言う「有効な濃度」とは、本発明に関わる方法を用いて活性化血球細胞を培養する場合、血球細胞を活性化させることができる時に使用するインターロイキンの濃度のことである。

【0024】

i. インターロイキン-1 (IL-1) : IL-1は単核細胞、マクロファージまたはTリンパ球およびBリンパ球の活性化に参与する付属細胞により分泌された可溶性たんぱく質であり (17kD、152アミノ酸)、これらの細胞の抗原またはに対する反応を強化する働きがある。IL-1はT細胞活性化に必要なマクロファージを置換することができる他に、幅広い他種の細胞を影響するなどの生物学効果がある。現在では、少なくとも二つのIL-1遺伝子が知られ、またIL-1のアルファ型とベータ型が確認された。IL-1は免疫反応の早期に単核細胞およびマクロファージにより放出され、T細胞の増殖とたんぱく質の合成を促進する。IL-1のもう一つの効果は発熱を発生させることである。

【0025】

ii. インターロイキン-2 (IL-2) : IL-2は刺激を受けたTリンパ球より放出されたホルモン状の物質であり、抗原にたよらずその他のTリンパ球を活性化させ、分化させる働きがある。免疫系のある種の疾病抵抗効果がある血球細胞の成長を刺激し、Th1 CD4細胞により分泌された場合は、CD8細胞障害Tリンパ球を刺激する効果もある。また、IL-2自体はCD4細胞の増殖および成熟化を促進できる。

【0026】

iii. インターロイキン-3 (IL-3) : IL-3は分裂促進因子により活性化されたT細胞の産物であり、骨髄幹細胞および肥満細胞のコロニー刺激因子としての働きがある。また、IL-3は一種の造血コロニー刺激因子である。

【0027】

iv. インターロイキン-4 (IL-4) : IL-4は活性化Tリンパ球が作った可溶性サイトカイン因子であり、B細胞の増殖および分化を促し、抗体の生成を促進する効果がある。IL-4はクラスIIに属する主要な組織適合性複合体およびB細胞上のFc受容体の発現を誘発できる。また、IL-4はTリンパ球、肥満細胞および顆粒球、巨核球、赤血球前駆細胞、マクロファージなどの造血系細胞に対しても影響を与える作用がある。

【0028】

v インターロイキン-5 (IL-5) : IL-5は好酸球の分化および造血機能の活性化を促進する因子である。また、活性化B細胞をIg分泌細胞への最終分化を誘発する働きもある。

【0029】

vi. インターロイキン-6 (IL-6) : IL-6はヒトB細胞の成長と分化を刺激できるの他に、との成長促進因子としての作用もある。いろんな細胞 (T細胞、単核細胞、線維芽細胞など) から生成することができるIL-6は単鎖のサイトカイン (25kD) であり、元々前B細胞成長促進因子と言われたが、現在では、IL-6は他の細胞 (T細胞など) を刺激し、増殖させる効果もあると認識された。

【0030】

vii. インターロイキン-7 (IL-7) : IL-7はB細胞成長促進因子であるの他に、インターロイキン-2と同様に成熟T細胞の活性化を促進する分裂促進的な作用もある。IL-7は骨髄間質細胞によって作られる。

【0031】

viii. インターロイキン-8 (IL-8) : IL-8は好中球を活性化させ、好中球とTリンパ球を引き付ける働きがあるサイトカインである。炎症刺激が存在する場合に、IL-8は単核細胞、マクロファージ、Tリンパ球、線維芽細胞、内皮細胞およびなどにより放出される。IL-8はに属し、血小板因子4とは構造上の関連がある。

【0032】

ix. インターロイキン-9 (IL-9) : IL-9はT細胞、特に分裂促進因子により刺激されたT細胞が作るサイトカインであり、赤血球前駆細胞 (BFUE) を増殖させる働きがあるの他に、造血制御の作用もあると思われる。と共同で作用できる。IL-9受容体は造血受容体ス

10

20

30

40

50

パーファミリーに属する。IL-9はヒト肥満細胞、巨核芽球性白血病細胞およびマウスヘルパーT細胞クローニングの成長を促進できる。IL-9はT細胞およびヒト染色体5のマップ由来の糖たんぱく質である。

【0033】

x. インターロイキン-10 (IL-10) : IL-10はTh2ヘルパーT細胞、一部のB細胞およびLPS活性化した単核細胞がつくる因子であり、肥満細胞の成長抑制因子の一つとしての作用がある。

【0034】

xi. インターロイキン-11 (IL-11) : IL-11は元々靈長類の骨髓間質細胞から分離された多面的なサイトカインであり、抗原特異性抗体の反応を調節し、巨核細胞を増強し、骨髓脂肪の形成を制御するなどの作用がある。IL-11はT細胞依存のB細胞の成熟、巨核球の形成および骨髓分化のいろんな段階を刺激できる。

【0035】

xii. インターロイキン-12 (IL-12) : IL-12サイトカインであり、で結ばれた40kDと35kDのサブユニットで構成する。これらのサブユニットは元々理想濃度を有しないインターロイキン-2との共同作用で障害効果細胞を誘発できるものとして認識されていた。IL-12はマクロファージが感染に反応して放出したものであり、細胞関与免疫を引き起こす作用がある。特に、IL-12はTh1 CD4細胞の成熟化、特異細胞障害Tリンパ球の反応およびNK細胞の活性化を促進できるため、細胞関与免疫のイニシエーターと考えられる。また、IL-12はNK細胞の細胞溶解性を高め、インターフェロンの生成を誘発し、活性化T細胞およびNK細胞の増殖を刺激するなどの作用もある。IL-12はヒトB細胞 (NC 37) によって生成する。

【0036】

xiii. インターロイキン-13 (IL-13) : IL-13はTリンパ球由来のサイトカインであり、免疫グロブリンの増殖、アイソタイプ転換、および未成熟Bリンパ球による免疫グロブリンの生成を誘発できる。活性化T細胞によって生成したIL-13は、単核細胞によるIL-6の生成を抑制するの他に、TNF、IL-1、IL-8などの炎症誘発性サイトカインの生成も抑制できる。IL-13の遺伝子はIL-4遺伝子を含む遺伝子集団にあるヒト染色体5q上に位置する。

【0037】

xiv. インターロイキン-14 (IL-14) : IL-14は一種のサイトカインであり、B細胞の増殖を誘発し、免疫グロブリンの分泌を抑制し、またある種のB細胞の亜集団を選択的に拡張させる作用がある。

【0038】

xv. インターロイキン-15 (IL-15) : IL-15はTリンパ球の増殖を刺激し、IL-2の生物活性を共有できるサイトカインであり、Bリンパ球の増殖と分化を誘発する作用もある。

【0039】

xvi. インターロイキン-16 (IL-16) : IL-16は活性化Tリンパ球がつくるサイトカインであり、CD-4陽性リンパ球および単核細胞の遊走を刺激する作用がある。

【0040】

B. リンホカイン : リンホカインとは、インターロイキン、インターフェロン・アルファ、リンホトキシン (腫瘍壊死因子アルファ)、顆粒球単核細胞コロニー刺激因子 (GM-CSF) など、白血球により产生し、他の細胞に働きかける物質である。

【0041】

i. インターフェロン(IFN) : IFNはヒト細胞がつくる糖たんぱく質の一種であり、一般にウィルスの増殖を抑制し、人体からウィルス感染を守る作用があると言われる。本発明において、IFNの濃度をインターロイキンの濃度とほぼ同じにするか、有効濃度にしても良い。ここで言う「有効濃度」とは、本発明に関わる方法で血球細胞を活性化する時に、血球細胞の活性化を実現するために使用するインターフェロンの濃度である。ちなみにIFNアルファとIFNガンマは、ウィルス感染が発生した時に、それぞれ白血球と線維芽細胞が产生するものである。

10

20

30

40

50

## 【0042】

1. インターフェロン・ガンマはTリンパ球が特定の抗原または分裂促進因子の刺激に対する反応として産生するインターフェロンである。

## 【0043】

2. インターフェロン・アルファはいくつかのサブタイプに分けられるが、共にウイルス感染または二本鎖のRNAによる刺激を受けた時に、白血球がつくるものである。IFN-アルファ-2Aおよび-2Bは組み替えDNA技術によりつくったたんぱく質であり、抗腫瘍薬として使われている。インターフェロン・アルファはタイプIインターフェロンの一種で、末梢血の白血球または細胞がライプウィルス、不活性化ウィルス、二本鎖RNAまたは細菌産物による刺激を受けた時につくるものである。インターフェロン・アルファはウイルス誘導の白血球培養体が産生する主要なインターフェロンであり、著しい抗ウイルス性があるの他に、ナチュラルキラー細胞を活性化する作用もある。

10

## 【0044】

3. インターフェロン・アルファ-2aはタイプIインターフェロンの一種であり、165個のアミノ酸残基を有し、23位置にリジンがある。このたんぱく質はDNA組み換え技術で作られたものであり、白血球が分泌するインターフェロンと似ていて、抗ウイルス剤または抗腫瘍剤として広く使われている。

## 【0045】

4. インターフェロン・アルファ-2bはタイプIインターフェロンの一種であり、165個のアミノ酸残基を有し、23位置にリジンがある。このたんぱく質はDNA組み換え技術で作られたものであり、白血球が分泌するインターフェロンと似ていて、抗ウイルス剤または抗腫瘍剤として広く使われている。

20

## 【0046】

5. インターフェロン・ベターはタイプIのインターフェロンの一種であり、線維芽細胞がインターフェロン・アルファと同じ刺激（ライプウィルス、不活性化ウィルス、または二本鎖RNAによる）を受けた時につくるサイトカインで、抗ウイルス性、抗増殖性および免疫調節性がある。

## 【0047】

6. インターフェロン-b2（インターロイキン-6）はヒトB細胞の成長と分化を刺激できるサイトカインで、雑種細胞腫およびプラズマ細胞腫の成長促進因子でもある。T細胞、単核細胞、線維芽細胞など多種類の細胞によって生成する。INF-b2は単鎖、25kDのサイトカインで、元々は前B細胞促進因子と言われたが、最近ではT細胞など他の細胞の増殖を刺激できることは認識された。INF-b2は急性期たんぱく質を誘発でき、また、コロニー刺激因子としてマウス骨髄に働きかけることができる。

30

## 【0048】

7. インターフェロン・ガンマはT細胞が特異性抗原または分裂促進因子の刺激を受けた時に産生するものである。

## 【0049】

ii. 腫瘍壞死因子（TNF）は一種の腫瘍抑制因子であり、細菌のリポ多糖が存在する時に血液に現れる。

40

## 【0050】

TNFは体内および体外において腫瘍細胞を優先的に殺し、マウスへ移植したある種の腫瘍の壞死を誘発し、実験的な移転を抑制できる。ヒトTNFアルファは157個のアミノ酸を有するたんぱく質であり、幅広い炎症誘発性がある。本発明において、TNFの濃度をインターロイキンの濃度とほぼ同じにするか、有効濃度にしても良い。ここで言う「有効濃度」とは、本発明に関わる方法で血球細胞を活性化する時に、血球細胞の活性化を実現するために使用するTNFの濃度である。

## 【0051】

C. 細胞刺激因子：本発明の方法で再生不良性貧血を治療するための血球細胞を活性化する時に、一種類または多種類の細胞刺激因子を利用すると一層良い効果が得られる。こ

50

のような細胞刺激因子は顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子およびマクロファージコロニー刺激因子が挙げられる。本発明においては、濃度10~50,000 IU/ml、10~10,000 IU/ml、10~1,000 IU/mlまたはその他の有効濃度を有する細胞刺激因子が使用される。ここで言う「有効濃度」とは、本発明に関わる方法を用いて活性化血球細胞を培養する場合、血球細胞を活性化させることができる時に使用する細胞刺激因子の濃度のことである。

#### 【0052】

1. 顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)：G-CSFは多種類の細胞によって合成される糖たんぱく質であり、造血幹細胞の成長と分化に関与する。さらに、この種の因子は幹細胞の端末細胞機能性を刺激することもできる。

10

#### 【0053】

2. 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)：

GM-CSFは23kD、内部ジスルフィド結合を有する酸性糖たんぱく質であり、炎症媒介物に対する反応として造血環境および炎症の周辺に存在する間葉細胞によって産生する。GM-CSFは骨髄細胞を刺激し、好中顆粒球、マクロファージおよび顆粒球とマクロファージの混合コロニーの生成を促進するの他に、胎児の肝臓前駆細胞を刺激し、好酸球コロニーの形成も促進できる。

#### 【0054】

3. マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)：M-CSFは間葉細胞によって合成されたサイトカインであり、骨髄の多能性幹細胞を刺激し、分化を誘発し、単核細胞（単核食細胞）の生成を促進する作用がある。また、単核マクロファージ系の造血細胞の生存、増殖および分化を刺激する働きもある。M-CSFは分子量70kD、ジスルフィド結合を有する二量体で、一種の高親和性受容体と結合している。なお、この高親和性受容体はc-fmsの産物と同じものである。

20

#### 【0055】

2. イオノフォア：イオノフォアはカルシュームまたはその他の陽イオン特異性の試薬であり、脂質二重層および脂溶性層を通過できる。イオノフォアは担体（carrier）とチャンネルフォーマー（channel former）の二種類に分けられる。担体（例えばバリノマイシン）は特定のイオンの周りにケージのような構造をなし、二重層の疎水区から自由に拡散できる。チャンネルフォーマー（例えばグラミシジン）は二重層を貫通した水性孔を形成するため、イオンはこの水性孔から拡散できる。本発明においては、上記イオノフォアの他に、A23187（カルシマイシン）、イオノマイシン、ゲルダナマイシン、モネンシン（Na塩）、ナイスタチン、硫酸ポリミキシンBおよびラパマイシンも含む。A23187のような担体はpH勾配の変化に応じてカルシューム陽イオンを蓄積する作用があると思われる。A23187は解離されたカルボン酸集団を有し、膜越しにプロトンを他の陽イオンに入れ替える中性化交換を促進できる（Hyonoら：BBA 389, 34-46 (1985)。Kolber and Haynes, Biophysics Journal, 36, 369-391 (1981)。Hunt and Jones, Biosci. Rep., 2, 921-928 (1982)）。A23187の二つの分子はカルボン酸陰イオンの形で存在するため、二価陽イオンを搬送し、放出した後に、プロトンまたはその同等物を膜内に持ち帰ることができる。イオノフォアを添加する場合は、その濃度は1~10,000 ng/ml、1~1000 ng/ml、10~500 ng/mlまたはその他の有効濃度にする。「有効濃度」とは本発明に関わる方法で血球細胞を活性化（過活性化になってはならない）する上に必要とするイオノフォアの濃度である。活性剤の濃度が高過ぎると本発明の治療法にとってはかえって効果が良くない。

30

#### 【0056】

##### 使用、包装および流通

患者に活性化細胞を投与することにより患者の臨床指標を著しく改善することができる。例えば、上記活性化細胞を患者に与えると患者血液中の白血球数、赤血球数、ヘモグロビンのレベルおよび血小板数は共に上昇することが見られる。一般に、本発明に関わる治療を継続に行うことにより、患者の血液は正常レベルに回復できる。本発明の実施例では、四回の治療を経て、患者の白血球数、赤血球数およびヘモグロビン数のすべては最低で

40

50

も20%上がり、また、35%、50%まで上がることもある。他の実施例では、血小板数は25%上がったり、50%上がったり、さらに100%まで上がったケースもある。勿論上記範囲内の血液指標の改善もあり、常識から見れば、本開示の一部になるので、ここでは贅言しないこととする。

#### 【0057】

本発明の一つの実施例では、流通のために、賦活化合物（例えば一種類または多種類のサイトカインおよび（または）一種類または多種類のイオノフォア）を適宜な細胞培養培地またはその一部と混合した。他の実施例では、運送を便利にするため、一種類または多種類の賦活化合物は細胞培養培地またはその一部と一緒に包装された。同様に、運送を便利にするため、一種類または多種類のサイトカインと一種類または多種類のイオノフォアを必要に応じて組み合わせて包装しても良い。この場合に、サイトカインとイオノフォアを混合しても良いし、別包装にしても良い。上記すべての実施例において、培地または賦活化合物をその他の培地成分または賦活化合物と組み合わせて、活性化条件下で細胞を活性化できる適宜な培地を形成するができる。さらに、上記すべての実施例において、上記成分の他に、細胞培養培地の完成方法または細胞培養の方法などに関する説明書も添付することもできる。

10

#### 【0058】

細胞の培養は患者を治療する施設において行っても良いし、離れた場所で行っても良い。いずれの場合でも、収穫した活性化細胞が生存している内に、できるだけ早く患者に投与しなければならない。細胞の生存を確保できる条件（例えば液体窒素の温度で）で細胞を保存しても良い。患者に投与する前に、適切な時間において、既知の方法（例えば緩衝食塩水で懸濁液をつくる）を用いて細胞を用意する。細胞を送達する時に既知の担体を使うと良い。

20

#### 【実施例】

#### 【0059】

##### 使用例1

##### 再生不良性貧血症の治療

###### I. 患者

患者八名、それぞれ1~6年の職業ベンジン曝露史がある。患者の同意を得て本発明に関する療法で治療を行った。患者の構成は男性一名、女性七名で、年齢は24~41歳。すべての患者には脱力感、眩暈、失神、高心拍数の症状が見られる。その内の四名は、出血の症状があったため、入院させ治療を受けることになった。入院患者に対し血液または血小板を輸液した。残りの四名の患者に対しては、慢性症状がメインであったため、それぞれ4ヶ月、6ヶ月および15ヶ月の標準治療を行った。造血機能を確認するために、すべての患者に対し骨髄組織切片および骨髄穿刺サンプルを採った。検査の結果によると、すべての患者の血液および骨髄の中には中毒レベルのベンジンが見られた。

30

#### 【0060】

###### II. 末梢血単核細胞の純化と細胞の培養

患者の血液サンプル（40-50 ml）を取り、Ficoll-Hypaque密度勾配遠心法を用いて末梢血単核細胞（PBMCs）を分離した。分離したPBMCsは適量（細胞の濃度により決める）の、10%牛胎児血清含有の RPMI1640 ( $2 \times 10^6$  cells/ml) に入れ、インターロイキン-2 (IL-2) 500U/ml (Chiron, Emeryville, Calif.)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 200IU/ml (Immunex, Seattle, Wash.) およびカルシューム・イオノフォア A23187100ng/ml (Sigma, St. Louis, Mo.) を添加し、滅菌条件下で48時間培養した。培養完了後に、培養容器のプラスチック表面に付着した細胞をすり落とし、付着していない細胞と共に収集した。細胞を得るために、遠心沈殿を行い、細胞のかたまりを小球状にした。各患者の細胞収穫量はそれぞれ違うが、共に生理塩水で二回洗浄し、患者に与えた。洗浄した細胞を5~10ml（細胞の量により決める）生理塩水で再度懸濁させ、患者に投与する前に50ml生理塩水で希釈した。

40

#### 【0061】

50

## 治療法

一名の患者（HC）の血球数は非常に低く、また出血と感染もあったため、最初三回の治療では、活性化同種PBMCsを全部この患者に投与した。その他の患者に対し、活性化PBMCsを50ml生理塩水に溶け、静脈内注射を行った。治療は毎週一回、計三週間続いた。特定の患者に投与した細胞の量はこの患者の血液サンプルから得た細胞の量により決める。

### 【0062】

#### III. 結果

##### 血液学指標

各患者に対し、治療前および治療後の血液指標（白血球数、赤血球数、ヘモグロビンのレベルおよび血小板数）を記録した（表1）。これらのデータは、本治療法は患者の末梢血血球細胞を有效地に増加させる効果があると示した。六名の患者には1項目以上の改善が見られ、二名の患者の血小板数に改善が見られた。多くの患者の血球数は二回目治療を受けた後に改善が現れ、活性化血球を継続に投与している間に、改善効果もだんだん大きくなつた。四回の治療を終えた時点で、八名患者の内、七名患者の血液指標は正常または正常に近い状態に回復した。今回の治療を通して、すべての患者の血球数が改善されたが、患者によってその改善の程度は同じではなかった。例えば、一部の患者の赤血球にごくわずかな改善しか見られなかつたが、血小板数は大きく改善されたなど。いずれにしても、すべての患者の血小板数は著しく増加した。

10

### 【0063】

他の患者と違つて、HCさんの症状は特にひどく、また出血も伴つた。HCさんの末梢血サンプルから得た活性化細胞の量が少なかつたから、HCさんの造血機能を刺激するため、同種のPBMCを投与した。このようなPBMCを利用して、三回治療を終えた時点から、HCさんの血球数が改善し始めた。それからHCさんの自体PBMCを利用して治療を続けた。六回の治療を終えた時点では、HCさんの血液指標は正常状態に回復されなかつたが、とにかく継続的に改善が見られた。

20

### 【0064】

今回の免疫療法を受けた患者には、軽い程度または中程度の不適しか見られなかつた。その内の五名はそれといった不適をぜんぜん感じなかつた。三名の患者は、細胞輸液を受けた後に悪寒、発熱（37～39）、頭痛、吐き気、食欲不振などが見られたが、いずれも一時的な症状であり、アスピリンを与えた1～2日後に完全に消えた。

30

### 【0065】

#### 骨髄の造血機能

最初治療前および最終治療が終えた二週間後に患者の骨髄組織切片および骨髄穿刺サンプルを取つた。図1に示すように、治療前に三名の患者の骨髄にはひどい損害が見られたが、治療後に著しい組織学上の改善が見られた。しかし、患者HCさんの場合は、骨髄の改善と末梢血球数の改善の間に関連性がなかつた。

### 【0066】

#### 輸血

治療前に、八名患者の内の四名は出血が伴つた重症が見られた。これらの患者に対しては、治療前および治療中に全血または血小板を周期的に輸液する必要があると判断したが、四回目の治療が終えた時点では、出血が止まつたので、全血または血小板の輸液を停止した。

40

### 【0067】

#### 期間

今回の細胞療法の効果は一時的なものと思わない。何故かと言うと、治療が終えた後でもすべての患者の血液指標は安定し、または引き続き改善が見られた。一部の女性患者の場合は、月経期間において血球数は安定しなかつたが、すべての患者において再発は見られなかつた。患者LCさんの場合は、最終治療が終えたから2ヶ月間においてその血液指標は安定していた（図2）。

### 【0068】

50

### 考察

今回の研究の結果から見れば、活性化PBMCは再生不良性貧血症患者に対し有効に治療できると言うことができる。

#### 【0069】

一部の患者の骨髄組織は正常状態に回復したが、末梢血の血液指標は正常ではなかった。これは、骨髄組織の回復と末梢血の回復の間には時間的なギャップがあるによるものと考えられる。このような患者に対し継続的な観察を行ったが、いずれの患者の血液指標には改善が見られた。なお、正常状態に回復するまでの時間、患者によって違うが、何週間または何ヶ月間が必要であった。

#### 【0070】

今回の研究のデータから見れば、血液の他の成分と比べて、血小板の改善は特に目立った。これは、血小板の生成周期が他の血液成分の生成周期より短いと考えられる。上記四つの血液成分の他に、データに載ってなかつたが、好中球数、顆粒球数および網状赤血球数も同時に改善された。血小板はベンジン曝露に影響されやすい血液成分ではあるが、本治療法の導入により、またその短い生成周期も一つの原因として、改善効果が著しかった。

#### 【0071】

後天性再生不良性貧血症は治療に困難な病気である。今まででは、この様な患者に対して骨髄移植を行うしか治療方法がなかつたが、本治療法（免疫抑制療法）を導入することにより、この病気を有効に治療できる。骨髄移植も非常に効果がある治療法ではあるが、腫瘍 (Socie et al., Malignant tumors occurring

after treatment of aplastic anemia, N. Eng. J. Med. 1993; 329(16): 1152-1157)、(Ferrara et al., Graft-versus-host disease, N. Engl. J. Med. 1991(324); 324: 667-674)などの副作用もかなり強い。それ以外に、手術費用は高く、適宜なドナーがなかなかいらないなどの原因で、たくさんの患者は骨髄移植を受けることができなかつた。このように、再生不良性貧血を治療できるより簡単、有効しかも副作用が少ない治療法に対する需要が高かつた。本発明に関わる方法を導入することにより、副作用を最大限に抑えながら、再生不良性貧血を治療することができる。また、本細胞療法（免疫療法）は、その他の貧血症および骨髄不全症の治療にも応用できる。このような病気は、例として、カクテル化学療法を受けたHIV感染患者に現れた病気、化学療法または放射線療法を受けた癌患者の骨髄不全、遺伝性再生不良性貧血および特発性血小板減少性紫斑病などが挙げられる。

#### 【0072】

本免疫療法のメカニズムを何か特定なの理論に限定したくないが、現段階では、本免疫療法の良い治療効果は下記いくつかの原因によるものと考えられる。1)活性化細胞は多種類の効果因子（その一部はいまだに解明されていない）を同時に分泌することができる。これらの因子の相乗効果で本療法の治療効果に導いた。2)活性化免疫細胞はいまだに分かっていない造血因子をつくり、本療法の効果（少なくとも一部の効果）をもたらした。3)免疫細胞は骨髄まで進み、そこで近い距離でサイトカインを造血幹細胞およびその他の前駆細胞に与えたと考えられる。また、これらの活性化免疫細胞は骨髄の近くにある期間において滞在し、結局骨髄のミクロ環境の改善をもたらした。4)免疫細胞間および造血細胞間のコンタクトは造血細胞の成長と分化にとって重要な役割を果たすと考えられる。5)活性化免疫細胞は、わずかな量であっても、免疫系統の造血機能に対する悪い影響を防止できる。たしかに10～100mlの血液から得たPCMBは微量なものではあるが、この微量のPCMBは骨髄の組織構造および造血機能に対し大きい影響を与えた。

#### 【0073】

今までの研究の結果から見れば、本発明の方法（活性化血球細胞を患者に投与する）の効果は考えられなかつた。ただ一つの例外があつた。Youngら（注2）は成長促進因子（顆粒球コロニー刺激因子と顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子）を患者に投与し、患者の好中球数を影響することであった。この研究は、顆粒球コロニー刺激因子の投与によ

10

20

30

40

50

り好中球数と血小板数は共に著しく増加したことを示した。インターロイキン-3の投与またはインターロイキン-3と顆粒球-マクロファ-刺激因子の併用よりも、むしろ単に成長促進因子を投与する方がより良い効果が得られた。Liuらは、活性化末梢血単核細胞およびインターロイキン-2を患者に与えると患者の貧血症とが「強調」されたことを見た (Liuら : Cellular interactions in hemopoiesis, Blood Cells 1987; 13: 101-110。Ettinghausenら : Hematologic effects if immunotherapy with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in cancer patients, Blood 1987; 69(6): 1654-1660)。

#### 【0074】

本発明はまた、製造に関する事項を含む。上記一種類または多種類のサイトカインとイオノフォアを別々の容器に包装したり、また上記容器は活性化細胞の培養に使ったり、またレベル、説明書などは商品に貼ったり、添付したり、さらに活性化細胞の培養に適した培地を添付したりすることもできる。

10

#### 【0075】

##### 使用例2

###### 血小板減少症の治療

本例では、特発性血小板減少性紫斑病の女性患者（年齢1年5ヶ月）に対する治療を説明する。この患者は9ヶ月の時に特発性血小板減少性紫斑病と診断された。

#### 【0076】

患者は、最初に副腎皮質ステロイドおよび免疫グロブリンの静脈内輸液などの通常治療を受けた。反応が見られたにも関わらず、患者はしっかり副腎皮質ステロイド療法を依存するようになった。血小板レベルを維持するために、患者はたえず副腎皮質ステロイドを受け、その投与量も大きくなる一方であった。

20

#### 【0077】

その後に、患者は上記活性化細胞を用いた治療を受けた。治療方法は使用例1とほぼ同じではあるが、血液サンプルの量は40～50mlのかわりに20mlにした。治療は週一回行い、治療期間は9週間。体外培養活性化細胞は、第1日目、第8日目、第15日目、第22日目、第29日目、第35日目、第42日目、第49日目および第56日目に患者に投与した。活性化細胞を用いた免疫療法を行う期間中に、副腎皮質ステロイドなどの通常療法を停止した。その結果、患者の血小板はだんだん正常レベルに回復した（図2）。第49日目に患者は肺感染があり、血小板レベルは著しく落ちたが、感染の回復と共に血小板レベルも正常に戻った。

30

#### 【0078】

出版物、特許、特許の出願書およびここに引用された他の文書はすべて、互いに参照することによって一体となっている。疑義が生じた場合は、本明細書に準ずる。

#### 【0079】

本発明の主旨を損なわないことを前提として本発明を修正することがあるため、本発明の範囲は上記実施例の範囲に限らない。本発明の範囲は添付した請求項または請求項と同等なものにより決める。

#### 【0080】

【表1】

細胞免疫療法治療前と治療後の患者の血液指標											
患者	年齢・性別	治療回数	タイプ	WBC ( $\times 10^3/\text{mL}$ )	RBC ( $\times 10^3/\text{mL}$ )	HGB (g/dL)	PLT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	WBC ( $\times 10^3/\text{mL}$ )	RBC ( $\times 10^6/\text{mL}$ ) ( $\mu\text{dL}$ )	HGB ( $\mu\text{dL}$ )	PLT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )
HC	32/F	6	急性	2.7 +/-	1.2 +/-	4.0+/-0.3	28+/-3	3.8+/-0.25	2.0+/-0.2	7.0+/-0.3	43+/-3
YM	29/F	4	慢性	0.2 +/-	0.1 +/-	11.1+/-0.4	99+/-11	6.7+/-0.3	3.9+/-0.4	12.7+/-0.5	182+/-17
TB	33/F	4	急性	0.3 +/-	0.5 +/-	8.4+/-0.4	47+/-5	4.7+/-0.3	3.2+/-0.3	11.5+/-0.7	107+/-11
LC	25/M	4	急性	0.2 +/-	0.3 +/-	5.7+/-0.3	16+/-7	5.7+/-0.2	4.8+/-0.3	13.5+/-0.7	135+/-14
YX	25/M	4	慢性	0.2 +/-	0.3 +/-	8.2+/-0.4	22+/-3	3.5+/-0.3	2.8+/-0.2	9.8+/-0.5	100+/-10
JX	29/F	5	急性	2.7 +/-	3.0 +/-	8.1+/-3.4	44+/-18	4.5+/-0.7	3.6+/-0.1	12.0+/-0.4	126+/-8
ZL	41/F	4	慢性	0.7 +/-	0.2 +/-	12.6+/-1.9	154+/-35	3.7+/-0.1	4.3+/-0.02	13.2+/-1.3	187+/-21
SC	29/F	4	慢性	0.6 +/-	0.6 +/-	10.0+/-3.5	54+/-4	2.8+/-0.2	2.9+/-0.2	11.0+/-0.3	71+/-8
				0.3	0.1						

治療前および治療後に患者の血液指標を五日連続に記録し、分析した。データ記号は、+/-：標準偏差、WBC:白血球、RBC:赤血球、HGB:ヘモグロビン、PLT:血小板。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0081】

【図1】図1は本治療を受けた三名の患者のH&E染色した骨髄組織切片の低倍率図である。A、C、Eは患者の治療前の骨髄である。空洞化した、損害を受けた骨髄は嚴重な再生不良性貧血を示している。B、D、Fは治療後の骨髄であり、図に示すように、骨髄細胞の分布と密度が共に改善されたことが分かる。

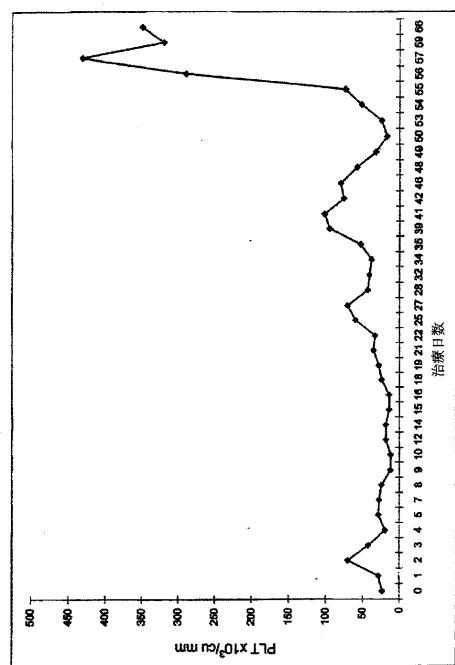
【図2】図2は、治療を受けた血小板再生不良性貧血の子供患者の血小板数を示す。

【図1】



Fig. 1

【図2】



---

フロントページの続き

(72)発明者 ヤング, デマオ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94043, マウンテン ビュ, スイート 16, ロック  
ストリート 1921番地

審査官 遠藤 広介

(56)参考文献 米国特許第05643786(US, A)

国際公開第99/047641(WO, A1)

国際公開第95/020649(WO, A1)

特表2002-511870(JP, A)

BRUGGER, W. et al, Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cell  
s by stem cell factor, interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, IL-3, interferon-gamma, a  
nd erythropoietin, Blood, 1993年, Vol.81, No.10, p.2579-2584

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 35/14

A61P 7/00

A61P 7/06

C12N 5/0786

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

BIOSIS(STN)

CAplus(STN)

EMBASE(STN)

MEDLINE(STN)