

- ① 前立腺全摘除術の施行時に、同じく郭清したリンパ節検体を用いる。
- ② 培養液を満したシャーレ内で、細かく切片化し、スライドグラスを用いてさらに細かく粉砕する。
- ③ 粉砕したリンパ節を含む培養液をメッシュに通し、細胞分画のみを分離する。
- ④ 前立腺全摘除術で得られた前立腺検体より、癌病巣部を punched out して採取する。なお採取病巣部の同定に関しては、当該検討の共同研究者である岡安 勲が確認、同定するものとする。
- ⑤ 同癌病巣から得られた腫瘍組織を、液体窒素での急速凍結ならびに解凍を繰り返し、腫瘍ペプチドの抽出を行う。
- ⑥ 上記③で分離したリンパ球と、腫瘍ペプチドとを共培養する。コントロール群として、上記③で分離したリンパ球のみを培養した群と、fibroblast と共培養した群も設定する。
- ⑦ ⑥から回収したリンパ球を ELISPOT アッセイ用のプレートに移し、IFN- γ を分泌している細胞のスポット数をそれぞれカウントする。

4. 末梢血リンパ球の解析（調節性 T 細胞についての解析を含む）

- ① 投与前、投与後 1～7 日目、14～21 日目、28 日目、42 日目、56 日目、57 日目、59 日目、63 日目、84 日目、以後 3 か月毎（術後 2 年まで）にヘパリンにてコーティングされた 5 ml の注射器を用いて、4.5 ml の血液を採取する。
- ② 抗体を含まない血液のみのコントロール、および 2 種の異なる蛍光色素でラベルされた各種交代の組み合わせ（CD45/CD14、CD3/CD19、CD3/CD8、CD3/CD4、CD8/HLA-DR、CD4/HLA-DR、CD3/HLA-DR、CD3/CD56+CD16、CD3/CD11b、CD4/CD25）を用いる。各血液検体 100 μ l とそれぞれの抗体各 20 μ l を、室温かつ遮光した状態で 30 分インキュベートする。
- ③ Coulter Q-Prep を用いて赤血球を除去し、固定する。A 液 635 μ l : (ギ酸)、B 液 265 μ l : (炭酸ナトリウム、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム)、C 液 100 μ l : (パラホルムアルデヒド)。
- ④ FACS 解析を行う（1 アッセイにつき、10,000 細胞以上）。