

厚生科学研究費補助金（厚生省がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書
新しいがん免疫療法の研究に関する研究

分担者 河上裕 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所細胞情報研究部門教授

研究要旨

免疫療法の科学的な開発において、重要なことの一つは標的癌抗原の同定である。本研究では、様々な癌種における癌抗原を同定するために、癌患者血清中 IgG 抗体が認識する抗原を単離する cDNA 発現クローニング法(SEREX 法)を用いて、癌患者生体内で免疫原性をもつ蛋白の単離同定を試みた。この方法を、まず、免疫原性が高いメラノーマにおいて、試した結果、その組織特異的発現性および免疫誘導能から、癌の診断・治療に有用である可能性のある新規癌抗原が単離された。次に、難治癌である膵癌に SEREX 法をおこなったところ、やはり、有用である可能性のある新規癌抗原が単離された。したがって、SEREX 法は、様々な癌種において、癌抗原の単離同定に有用であると考えられ、今後、本法により、様々な癌種における癌抗原の単離を行う予定である。

A. 研究目的

各種癌患者血清中 IgG 抗体が認識する、癌患者において免疫原性をもつ癌蛋白遺伝子を cDNA 発現クローニング法(SEREX 法)を用いて単離同定し、免疫療法において標的抗原として使用できる癌抗原を同定する。

B. 研究方法

各種癌細胞からラムダファージ上に cDNA 発現ライブラリーを作製して大腸菌に発現させ、癌患者血清抗体を用いたスクリーニングにより癌抗原遺伝子を単離する(SEREX 法)。単離した抗原は、各種癌患者および健常人血清における単離抗原に対する IgG 抗体の存在を調べるとともに、RT-PCR 法やノーザンプロット法により組織特異的発現性を検討して、新しい診断法や免疫療法に有用となる可能性のある癌抗原を同定する。有用である可能性のある癌抗原に対しては、その全長 cDNA 単離による、遺伝子・蛋白の構造解析、機能推定、免疫原性の検討を詳細に行う。

(倫理面絵の配慮)

検体は、倫理委員会に資料を提出し審議

して承認を得た後に、本人の了承を得た上で取得し研究に使用する。

C. 研究結果

我々は、まず、比較的免疫原性が高く、免疫療法にもよく反応するメラノーマにおいて SEREX 法による癌抗原単離を試みた。尋常性白斑を合併し、治療後、比較的予後のよかったメラノーマ患者血清を用いて、高色素産生性メラノーマ細胞株 SKmel23 から作製した cDNA ライブラリーをスクリーニングした。これは、抗腫瘍効果をもつ免疫反応が起きた可能性のある患者血清を用いて、その標的抗原である可能性がある色素細胞特異蛋白を単離できる可能性を考えたからである。その結果、50 個の陽性クローンを単離され、そのうち、20 種類は既知蛋白を、6 種は機能不明な蛋白をコードする遺伝子であった。これら抗原の mRNA 発現および、様々な癌患者と健常人血清中の IgG 抗体の存在を検討した。最も多くのクローンが単離された一つの抗原に対する抗体は、メラノーマ患者 22 人中 5 人の血清中に検出され、メラノーマ以外の癌患者 21 人中 9 人の血清にも検出されたが、30 人の健常人と 12 人の尋常性白斑患者血清からは検出されなかった。また、

メラノーマ細胞株と培養色素細胞に高発現が認められ、メラノーマ腫瘍組織および他の癌細胞株でも発現が認められたが、正常組織における発現は精巢に限られていた。本抗原は部分配列が EST データベースに登録されているだけの機能不明な蛋白であるが、その構造から細胞内蛋白であることが推定された。この抗原は、その発現特異性および免疫原性から、癌の診断、治療に臨床応用できる可能性があり、SEREX 法により、このような臨床に有用な可能性を秘めた新規分子が単離できることが示された。

つぎに、早期診断が困難で良い治療法が存在しない難治癌であり、世界的にも SEREX 法が行われたことがまだない膵癌に対し、SEREX 法による癌抗原の単離を試みた。5 人の患者血清を用いて 3 つの膵癌細胞株から作製した cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、47 個の陽性クローンを単離し、19 種類の異なる遺伝子を同定した。13 個は既知遺伝子、6 個は機能不明の蛋白をコードする遺伝子であった。そのうちの一つは、健常人血清とは反応せず、膵癌患者血清のみと反応し、mRNA レベルでは、膵癌細胞株、膵癌組織だけでなく、乳癌、大腸癌、食道癌細胞株、および正常精巢に高発現を認めたが、他の培養細胞や正常組織では、ほとんど発現が認められなかった。したがって、この抗原も、膵癌や他の癌において、診断や治療の標的として臨床応用の可能性があることが示唆された。

D. 考察

近年、世界的に癌抗原の同定が進められているが、免疫療法に有用な抗原は、まだ、少数しか同定されていない。本研究においては、癌細胞の株化と腫瘍反応性 T 細胞の樹立が 難しい多くの癌にも適応可能な SEREX 法を用いて、新規ヒト癌抗原の単離を試みた。最初に免疫原性が高いメラノーマで SEREX 法を試みたところ、診断、治療に臨床応用できる可能性を示す新規癌抗原が得られ、本法が有用な癌抗原の単離に有効であることが示唆された。つぎに難

治癌である膵癌を用いて行ったところ、同様に臨床応用できる可能性をもつ新規癌抗原が単離された。今後、本年、単離したメラノーマ抗原と膵癌抗原のより詳細な解析と臨床応用の可能性を追究するとともに、SEREX 法を他の様々な癌種にも応用して、より多くの癌抗原を同定していく予定である。

E. 結論

SEREX 法を用いて、新規メラノーマ抗原と膵癌抗原の単離同定に成功した。これら抗原は、その組織発現特異性および免疫原性から、癌の診断および免疫療法の標的抗原として有用である可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawakami, Y., Immunotherapy of melanoma using T cell defined antigens. in "Cell Therapy" Ikeda, Y, Hata, J, Koyasu, S, Kawakami, Y, Hattori, Y, eds. Keio University Symosia for Life Sciences and Medicine, vol 5, p77-92, Springer, Tokyo, 2000.
2. Kawakami, Y., Suzuki Y., Shofuda T., Kuniwa Y., Inozume T., Dan K., Sakurai T. and Fujita T. : T cell responses to melanoma and melanocytes. Pigment Cell Research, 13:163-169, 2000.
3. Kawakami, Y. : New cancer therapy by immunomanipulation: Development of immunotherapy for human melanoma as a model system. Cornea, 19: 2-6, 2000.
4. Kageshita T, Kawakami, Y., and Ono T. : Clinical significance of MART-1 and HLA-A2 expression and CD8+ T cell infiltration in melanocytic lesions in HLA-A2 phenotype patients. J Dermatol Science 25: 36-42, 2001.
5. Kawakami, Y., Wang X., Shofuda T.,

Sumimoto H., Tupesis J.P., Fitzgerald E., and Rosenberg S.A. : Isolation of a new melanoma antigen, MART-2, containing a mutated epitope recognized by autologous tumor infiltrating T lymphocytes. J Immunolgy. 166: 2871-2877, 2001.

2.学会発表

第100回日本外科学会、2000年
赤田昌紀、藤田知信、鈴木ゆり子、砂村真琴、松野正紀、河上裕
SEREX法を用いた膵癌抗原の解析

第25回日本研究皮膚科学会、2000年
木庭幸子、藤田知信、鈴木ゆり子、齊田俊明、河上裕
尋常性白斑を合併したメラノーマ患者の血清IgG抗体が認識するメラノーマ抗原の単離

H. 知的財産の出願・登録状況
河上裕、木庭幸子、藤田知信：「ヒト悪性黒色腫抗原」、特許番号2000-161252

河上裕、赤田昌紀、藤田知信：「ヒト膵癌抗原」、特許番号2000-161930

癌のワクチン療法に関する研究

分担研究者 伊東恭悟 久留米大学医学部免疫学講座教授

研究要旨 平成 12 年度は主としてペプチドワクチン第 I 相臨床試験を山名秀明教授との共同にて、これまでに同定した 11 種類の HLA-A24 拘束性ペプチド分子、2 種類の部分ペプチド及び 1 種類の HLA-A26 拘束性分子について実施しその多くを終了した。対象疾患症例は、インフォームドコンセントの文書確認のできた高度進行上皮癌（肺癌、大腸癌、食道癌、乳癌、子宮癌及び卵巣癌）症例である。本学倫理委員会にて承認を得た 7 つのプロトコールのもとに実施されている。臨床研究は平成 11 年度から開始し、これまでに 35 症例において単独抗原由来ペプチドによる第 I 相臨床試験を終了した。重篤な有害事象は全くなく、またペプチド投与により癌に対する CTL 増強が 60% の症例で得られた。また、ペプチド特異的 CTL 誘導は 80% の症例で得られた。さらにそれらの成果に基づいて、第 2 世代としての CTL precursor-oriented peptide vaccine 第 I 相臨床試験を現在までに 20 症例にて実施中である。

A. 研究目的

本研究の主目的は、ヒト HLA 拘束性癌特異的 CTL 株を作製、その認識する癌拒絶抗原遺伝子をクローニングし、上皮性癌患者に対して臨床応用可能な腫瘍特異免疫療法の標的分子を開発することである。本邦において多発する癌、即ち肺癌、消化管癌（食道癌、胃癌、大腸癌）、肝癌、頭頸部癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、腎癌及び白血病を主な対象とし、組織型としてはそれらの大部分を占める扁平上皮癌及び腺癌に絞って研究する。HLA としては本邦でも発現頻度の高い HLA-A24（癌患者の 6 割）、HLA-A2（約 4 割）、及び HLA-A26（約 2 割）抗原拘束性の CTL 認識性癌退縮抗原の同定を目指す。

B. 研究方法

1) 癌ワクチン開発（臨床研究）：HLA 拘束性 CTL 誘導可能なペプチド分子については、GMP グレード（臨床応用可能）のペプチドを不完全フロインドアジュバンド（montanide ISA-51）と共に皮下投与する臨床第 I 相試験を開始した。個々のプロトコールについては、本学倫理委員会にて審査を受け承認されたものに限って開始した。エンドポイントは有害事象の有無及び CTL 誘導能の有無である。有害事象の判定は JCOG の毒性判断基準に従った。CTL 誘導能の有無は、CTL precursor frequency analysis を主として採用し、癌特異性及びペプチド特異性の両者を算出し、細胞性免疫の定量化を行った。さらに平成 12 年 10 月からはペプチド特異的 CTL 前駆体をワクチン投与前に決定し、該当する

ペプチドのみを投与する CTL precursor-oriented peptide vaccine を開始した。

（倫理面への配慮）

本学内での倫理委員会での審査を経て、これまで 7 つの臨床試験を実施した。試験毎に専任の臨床研究コーディネーター（有医師資格の本学助手）が、被験者から自由意志による十分な説明を受けた上での同意（インフォームド・コンセント）を得て常時実施した。現在進行中の CTL precursor-oriented peptide vaccine の第 I 相臨床試験においては、専任の臨床研究コーディネーターの他にデータマネージャー及び臨床試験看護婦の参加をえて、臨床研究の充実と患者や家族への十分な対応が可及的にできる体制をひいている。

C. 研究結果

これまでの解析では、投与したペプチドによる有害事象は局所の発赤、腫脹以外認められていない。また、癌細胞及び投与ペプチドに対して特異的認識を示す CTL が 6 割の症例においてペプチド投与後増加（もしくは誘導）していることが確認された。さらに、平成 12 年 10 月からは、患者末梢血のペプチド特異的 CTL 前駆体を確認しての CTL precursor-oriented peptide vaccine をより有効な癌ワクチンとして HLA-A24 及び A2 の各種癌患者に対して第 I 相臨床試験として実施中である。

D. 考察

いずれのペプチドワクチンにおいても安全性が確認され且つ CTL 誘導能も癌細胞及びペプチドに対

して認められた。一方、PR以上の腫瘍退縮はペプチドワクチン単独では得られず、今後の最大課題として残されている。

E. 結論

7つの異なるペプチドワクチン第I相臨床試験を開始し、その安全性を確立し、またCTL誘導能の有無を明らかにした。簡便なペプチド特異的CTL前駆体の同定法を開発した。第2世代のCTL precursor-oriented peptide vaccineを平成12年より開始した。

F. 健康危険情報

平成11年度から実施したペプチドワクチン第I相臨床試験は、35名の高度進行上皮癌患者に対して実施された。有害事象/薬物有害反応としては、ワクチン投与部位の発赤、腫脹(グレードI)が約80%において認められた。それらに対する投薬、その他の医療処置は必要なく、また上記の有害事象以外は認められなかった。一方、平成12年10月から開始したCTL前駆体同定に基づくペプチドワクチン第I相臨床試験は、平成13年度3月1日現在で高度進行癌患者20名に対して実施中である。有害事象としては、10名においてワクチン投与部位の発赤、腫脹(グレードI)が認められ、5名においては発赤、腫脹の他に硬結及び疼痛(グレードII)が認められた。グレードIIの局所炎症反応に対して抗ヒスタミン軟膏の塗布を必要とした。それ以外の有害事象は認められていない。以上より、重篤な健康危険を疑わせる有害事象/薬物有害反応はワクチン投与により生じていないと判断される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1-1. 論文発表 (英文査読誌掲載論文)

1. Nakao, M., Shichijo, S., Imaizumi, T., Inoue, Y., Matsunaga, K., Yamada, A., Kikuchi, M., Tsuda, N., Ohta, K., Takamori, S., Yamana, H., Fujita, H., and Itoh, K.: Identification of a gene coding for a new squamous cell carcinoma antigen recognized by the CTL. *J. Immunol.*, 164:2565-2574, 2000.

2. Inoue, Y., Nakao, M., Matsunaga, K., Kikuchi, M., Gomi, S., Toh, U., Takamori, S., Yamana, H., and Itoh, K.: Induction of human leukocyte antigen-A26-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by a single

peptide of the SART1 antigen in patients with cancer with different A26 subtypes. *J. Immunother.*, 23:296-303, 2000.

3. Kawagoe, H., Yamada, A., Matsumoto, H., Ito, M., Ushijima, K., Nishida, T., Yakushiji, M., and Itoh, K.: Serum MAGE-4 protein in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol.*, 76:336-339, 2000.

4. Murayama, K., Kobayashi, T., Imaizumi, T., Matsunaga, K., Kuramoto, T., Shigemori, M., Shichijo, S., and Itoh, K.: Expression of the SART3 tumor-rejection antigen in brain tumors and induction of cytotoxic T lymphocytes by its peptides. *J. Immunother.*, 23:511-518, 2000.

5. Shintaku, I., Kawagoe, N., Yutani, S., Hoshi, S., Orikasa, S., Yoshizumi, O., and Itoh, K.: Expression of the SART1 tumor rejection antigen in renal cell carcinoma. *Urol Res.*, 28:178-184, 2000.

6. Kawano, K., Gomi, S., Tanaka, K., Tsuda, N., Kamura, T., Itoh, K., Yamada, A.: Identification of a new endoplasmic reticulum-resident protein recognized by HLA-A24-restricted tumor-infiltrating lymphocytes of lung cancer. *Cancer Res.*, 60:3550-3558, 2000.

7. Ito, M., Shichijo, S., Miyagi, Y., Kobayashi, T., Tsuda, N., Yamada, A., Saito, N., and Itoh, K.: Identification of SART3-derived peptides capable of inducing HLA-A2-restricted and tumor-specific CTLs in cancer patients with different HLA-A2 subtypes. *Int. J. Cancer*, 88:633-639, 2000.

8. Kawagoe, N., Shintaku, I., Yutani, S., Etoh, H., Matuoka, K., Noda, S., and Itoh, K.: Expression of the sart3 tumor rejection antigen in renal cell carcinoma. *J. Urol.*, 164:2090-2095, 2000.

9. Nishizaka, S., Gomi, S., Harada, K., Oizumi, K., Itoh, K., and Shichijo, S.: A new tumor rejection antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes infiltrating into a lung

adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 60:4830-4837, 2000.

10. Toh, U., Yamana, H., Sueyoshi, S., Tanaka, T., Niiya, F., Katagiri, K., Fujita, H., Shirozou, K., and Itoh, K.: Locoregional cellular immunotherapy for patients with advanced esophageal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 6:4663-4673, 2000.

11. Harashima, N., Tanaka, K., Sasadomi, T., Locoregional, Y., Miyagi, Y., Yamada, A., Tamura, M., Yamana, H., Itoh, K., and Shichijo, S.: Recognition of the Lck tyrosine kinase as a tumor antigen by T cells of metastatic cancer patients. *Eur. J. Immunology*, 31:323-332, 2001.

12. Suefujii, Y., Sasatomi, T., Shichijo, S., Nakagawa, S., Deguchi, H., Koga, T., Kameyama, T., and Itoh, K.: Expression of SART3 antigen and induction of CTLs by SART3-derived peptides in breast cancer patients. *British J. Cancer*, 2001, in press.

13. Ito, M., Shichijo, S., Tsuda, N., Ochi, M., Harashima, N., Saito, N., and Itoh, K.: Molecular basis of T cell-mediated recognition of pancreatic cancer cells. *Cancer Research*, 2001, in press.

14. Yutani, S., Shichijo, S., Inoue, Y., Kawagoe, N., Okuda, K., Kurohiji, T., Tanaka, M., Sata, M., and Itoh, K.: Expression of the SART1 tumor-rejection antigen in hepatocellular carcinomas. *Oncol Rep.*, 8:369-372, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 10-291702, 2000-116383

「ヒト癌退縮抗原タンパク質 (ART-4)」

2) PCT/JP00/05220, 11-222101

「腫瘍抗原 (ck)」

3) 2000-393047

「腫瘍抗原 (IP-9)」

4) 2000-231814

「腫瘍抗原 (Panc-1)」

5) 2000-345094

「細胞性免疫検出法」

6) 2000-304155

「肺癌細胞由来 (11-18)」

7) 「大腸癌細胞由来 HLA-A2 拘束腫瘍抗原」(予定)

8) 「大腸癌細胞由来 HLA-B46 拘束腫瘍抗原」(予定)

9) 「ペプチド脱感作療法」(予定)

10) 「ペプチド特異的キラーT 細胞前駆体同定に基づくワクチン療法」(予定)

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

分担研究報告書

難治性癌に対するワクチン療法の開発と臨床評価

研究者 珠玖 洋 三重大学医学部 教授

研究要旨：本研究で我々は、野生型原癌遺伝子 HER2 を標的とした細胞性免疫による癌の免疫的治療を開発する。具体的には、HER2 蛋白内に含まれる CTL エピトープ及びヘルパーエピトープの両者を提示し得る組み替え蛋白と疎水化多糖類プルランとの複合体により、独自の癌ワクチン開発を行う。本年度は事実、この複合体が CTL エピトープ及びヘルパーエピトープの存在が CTL エピトープに反応する CD8⁺CTL の活性を増強することを明らかにした。

A. 研究目的

本研究は乳癌、卵巣癌、非小細胞性肺癌等の 20～40%に発現されている野生型原癌遺伝子 HER2 を標的としてのワクチン療法を中心とした免疫療法の開発を目指すものである。とりわけ、日本人の約 60%が所有している HLA-A2402 結合性 HER2 由来ペプチドを既に同定していることより、多くの癌患者を対象とした治療法として展開する可能性が期待出来る。本研究では、既に同定した HER2p63-71 ペプチドを含んだ HER2 組み換え蛋白を用いた癌ワクチンの基礎的臨床的な開発研究と共に、免疫的モニタリング法の検討、及びサイトカインや樹状細胞の使用によるより有効な免疫治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

- (1) 天然多糖プルランに疎水基としてコレステロール基を 100 単糖当たり 1～5 個(重量比で 5%以下)導入し、次の様な疎水化多糖を合成した。 $-O-(CH_2)_mCONH(CH_2)_nNH-CO-O-R$ (R はステロール酸基を、m は 0 又は 1 を、n は任意の正の整数をそれぞれ示す)これらの疎水化多糖類は、水溶液中で自己会合して単分散なナノサイズ(20nm 程度)のヒドロゲル微粒子を形成する。この微粒子は、球状蛋白質を自発的に包接する。
- (2) ヒト HER2 の組み替え蛋白(N 末端より147アミノ酸残基を含む)を大腸菌で作製した。この組み替え HER 2 蛋白の場合には、1-2 蛋白分子がひとつの微粒子に取り込まれる。

(倫理面への配慮)

現時点では該当するものはなし。

C. 研究結果

1. 組み替え HER2 蛋白とコレステロール疎水化多糖類プルランの複合体(CHP-HER2)により HLA-A2402 陽性および陰性の健常人より調整された末梢血 CD14

⁺細胞由来樹状細胞を前処置した。処置 18 時間後に、これらの樹状細胞の HLA-A2402 拘束性 HER2p63 ペプチド特異的 CD8⁺CTL クローンに対する感受性を検討した。CHP-HER2 前処置の HLA-A2402 陽性樹状細胞のみが CTL クローンにより殺傷され、コントロール複合体で処置された樹状細胞及び HLA-A2402 陰性樹状細胞は全く感受性を示さなかった。さらに HLA-A2402 陽性樹状細胞を CHP-HER2、CHP、HER2 蛋白のみ等にて前処置した後に HER2p63 特異的 CTL クローンに対する刺激能を検討した。CHP-HER2 によって前処置された樹状細胞のみが CTL クローンを刺激しインターフェロン γ の産生を促したが、CHP、HER2 蛋白、CHP とコントロール蛋白の複合体により前処置された樹状細胞は何ら刺激活性を示さなかった。CHP-HER2 前処置樹状細胞の HER2p63 ペプチド提示に関わる分子を明らかにすべく、CHP-HER2 前処置樹状細胞を各種 inhibitor で処理し、ペプチド提示能に対する影響を検討した。サイトカリン D、プレフェルディン A、サイクロヘキサマイド、及びラクトシスティン前処置樹状細胞はペプチド提示能を消失した。又、CHP-HER2 前処置 HLA-A2402 陽性樹状細胞により、自家末梢血リンパ球を感作し、HER2p63 特異的 HLA-A2402 拘束性 CTL クローンを樹立できた。

2. CHP-HER2 免疫 BALB/c マウスの膝窩リンパ節由来リンパ球を in vivo で CHP-HER2 及び同系脾細胞の存在下で1週毎に刺激し培養を行った。得られた CD4⁺T 細胞をライン化し、特異性を解析した。12個の CD4⁺ヘルパー T 細胞株が作製された。HER2 蛋白(N 末端より 147 個のアミノ酸からなる)に含まれる 25mer ペプチドを 10 アミノ酸ずつのオーバーラップにて N 末端より作製し、CD4⁺T 細胞株との反応性を検討した。少なくとも 5 種の独立したペプチドに反応する CD4⁺細胞ラインが存在した。HER2 蛋白中には少なくとも 5 種類のエピトープが存在することが明らかとなった。

D. 考察

CHP-HER2 で免疫することにより HER2p63 特異的 CD8⁺K^d 拘束性でのマウス CTL を誘導し得ることを既に明らかにしている。本年度は、HER2p63 が HLA-A2402 を有したヒトにおいても CTL を誘導し得ることより、CHP-HER2 前処置樹状細胞が HER2p63 を HLA-A2402 と提示し得るか否かを直接解析し、その可能性を実証した。CHP-HER2 は樹状細胞の貧食作用によって取り込まれ、サイトゾール内に移行し、その後は内在性蛋白抗原と同じような形で MHC クラス I 分子結合性ペプチドとして提示される可能性が示された。BALB/c マウスを用いた解析結果により現在我々が用いている 147 個のアミノ酸から成る HER2 蛋白中には少なくとも 5 種類の異なった CD4⁺ヘルパー T 細胞のエピトープペプチドが存在していることが明らかとなった。このことは CHP-HER2 は MHC クラス I 結合性エピトープペプチドのみならず、ヘルパーエピトープをも MHC クラス II と共に提示し得ることを示している。最も解析を進めている一つのエピトープは、HER2p16-30 の 15 のアミノ酸中に含まれていることが明らかとなった。

E. 結論

CTL エピトープとヘルパーエピトープの両者を含む HER2 組み換え蛋白と疎水化多糖類の複合体をワクチンとして利用し、CTL とヘルパー T 細胞の両者を活性化し得ることを明らかにし得た。

F. 健康危険情報

現時点では該当するものはなし。

G. 研究発表

1. Okugawa, T., Ikuta, Y., Takahashi, Y., Obata, H., Tanida, K., Watanabe, M., Imai, S., Furugen, R., Nagata, Y., Toyoda, N. and Shiku, H.: A novel HER2-derived peptide homologous to the mouse Kd restricted tumor rejection antigen can induce HLA-A24 restricted cytotoxic T lymphocytes in ovarian cancer patients and healthy individuals. *Eur. J. Immunology*. 11: 3338-46, 2000.
2. Hanson, H. L., Donermeyer, D. L., Ikeda, H., White, L. M., Shankaran, V., Old, L. J., Shiku, H., Schreiber, R. D. and Allen, P. M.: Eradication of Established Tumors by CD8⁺ T Cell Adoptive Immunotherapy. *Immunity* 13: 265, 2000.
3. Ikuta, Y., Okugawa, T., Furugen, R., Nagata, Y., Takahashi, Y., Wang, L., Ikeda, H., Watanabe, M., Imai, S. and Shiku, H.: An HER2/neu-derived peptide, a Kd-

restricted murine tumor rejection antigen, induced HER2-specific HLA-A2402-restricted CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *Int. J. Cancer* 87: 553-558, 2000.

4. Mitani, H., Katayama, N., Araki, H., Ohishi, K., Kobayashi, K., Suzuki, H., Nishii, K., Masuya, M., Yasukawa, K., Minami, N. and Shiku, H.: Activity of interleukin 6 in the differentiation of monocytes to macrophages and dendritic cells. *Br. J. Haematol.* 109: 288-295, 2000.
5. Sawa, H., Kobayashi, T., Mukai, K., Zhang, W. and Shiku, H.: Bax overexpression enhances cytochrome c release from mitochondria and sensitizes KATOIII gastric cancer cells to chemotherapeutic agent-induced apoptosis. *Int. J. Oncology* 16: 745-749, 2000.
6. Nakase, K., Bradstock, K., Sartor, M., Gottlieb, D., Byth, K., Kita, K. Shiku, H. and Kamada, N.: Geographic heterogeneity of cellular characteristics of acute myeloid leukemia: a comparative study of Australian and Japanese adult cases. *Leukemia*. 14: 163-168, 2000.
7. Nishii, K., Katayama, N., Mitani, H., Matsumoto, T., Miwa, H., Kita, K. and Shiku, H.: Effects of cyclosporin A on refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int. J. Hematology*. 71: 59-65, 2000.
8. Nakase, K., Hasegawa, M., Tsuji, K., Ikeda, T., Tamaki, S., Tanigawa, M., Miyanishi, E. and Shiku, H.: HTLV-1 unrelated adult T-cell unique phenotype and karyotype. *Amer. J. Hematology* 64: 64-66, 2000.
9. Toyoda, H., Nakamura, T., Shinoda, M., Suzuki, T., Hatooka, S., Kobayashi, S., Ohashi, K., Seto, M., Shiku, H. and Nakamura, S.: Cyclin D1 expression is useful as a prognostic indicator for advanced esophageal carcinomas, but not for superficial tumors. *Digestive Diseases & Sciences*. 45: 864-869, 2000.
10. Nakase, K., Wakita, Y., Minamikawa, K., Yamaguchi, T. and Shiku, H.: Acute promyelocytic leukemia with del(6)(p23). *Leukemia Research* 24: 79-81, 2000.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

現時点では該当するものはなし。

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
平成12年度分担研究報告書

「膵がんに対する免疫療法」

分担研究者 岡 正朗 山口大学医学部・教授

研究要旨：

膵がんの予後改善を目的に各種免疫療法を施行した。膵がん治癒切除12例でMUC1-CTL細胞療法を行い、術後肝転移再発は完全に防止され、1年生存率は約90%であった。切除不能膵がんでは、樹状細胞とMUC1-CTL細胞療法およびMUC1ペプチドワクチン第I相試験を行った。HLA-A2拘束性およびHLA-A24拘束性腫瘍拒絶抗原の反応性を判定する簡便法を確立した。

A. 研究目的

膵がんの予後は極めて不良であり、各種免疫療法を行い、その効果を検討し、膵がんの予後改善を目指す。切除例に対しては、MUC1-CTLによる細胞療法を膵がん切除後1週目に行い、肝再発防止効果と予後の改善を観察する。切除不能例では、樹状細胞を用いた細胞療法を行いその効果を観察すると共に、ペプチドによる膵がんワクチン療法を行う。ペプチド療法は2種類のプロトコルで行う。MUC1ペプチドによる第I相試験を行い、その安全性と有効性を確認する。また、がん退縮抗原ペプチドに対する反応をin vitroにて判定する方法を開発し、同ペプチドによる第I相試験を行い、その結果より第II相、第III相試験に展開する。

細胞療法：

(1) 膵がん切除例に対する術後MUC1特異的CTL療法

膵がん切除例を対象とする。術前、leukopheresisにより患者末梢血のリンパ球分画を採取する。

AIMV培養液でヒト膵がん細胞株(YPK-1)と単核球を1:1000の比率に調節し、CO₂-incubator内で3日間培養する。その後、IL-2を添加し、さらに7日間培養し、MUC1特異的CTLを誘導する。術前に誘導したCTLを術後1週間以内に投与し、再発形式および生存期間を検討する。

(2) DCによる切除不能膵がん患者の細胞療法

樹状細胞を誘導し、MUC1ペプチドにて刺激を行い、CTLを誘導した。誘導方法は、切除不能膵がん患者よりleukapheresisにて末梢血より単核球を分離し、プラスチック接着細胞を得る。同細胞をinterleukin-4およびGM-CSFにて6日間培養後MUC1ペプチドにて刺激を行う。さらにIL-4, GM-CSF, TNF- α を添加し、4日間培養後、再度MUC1ペプチドにて刺激を行い成熟型樹状細胞を誘導する。flow cytometryにより成熟型樹状細胞が誘導できることを確認した。

ペプチドワクチン療法：

(1) 膵がんにおけるがん退縮抗原ペプチド判定試験の開発：
96穴U-bottomのプレートに患

者より採取したPBMCsを10万個/wellとし、ペプチドを10 μ Mに調整した培養液にてquadricateで10~14日間培養し、target cellにペプチドを乗せてIFN- γ production assayにてペプチド特異的CTL誘導の有無を判定する。この間培養液半量交換時に計3回ペプチド刺激を追加した。

臨床的研究：

(2) MUC1ペプチドワクチンの毒性、安全性および免疫反応性

倫理委員会で許可を得た後、Cyclophilin-BまたはSARTペプチドを不完全フロインドアジュバントと混合してエマルジョン化し、膵がん切除不能例に皮下投与、その毒性と安全性および免疫反応性(DTH)について検討する。

なお、免疫療法の臨床試験においては、倫理審査委員会での審査を経て、承認を得た後、厳格なインフォームドコンセントを取得した上で実施する。また、治療に用いられる免疫担当細胞については、GMP基準に乗った方法での採取、増殖、投与に心がける。

C. 研究結果

膵がん切除12例においてMUC1-CTLを用いた細胞療法を行い、術後肝転移再発は完全に防止された。1年生存率は約90%であり、4カ月で死亡した症例は、急激な局所再発によるものであった。

肝転移を有する2例の膵がん切除不能例に、樹状細胞とMUC1-CTLにて治療したところ、1例で6カ月間のNCを得た。

HLA-A24拘束性の腫瘍拒絶抗原ペプチド13種類、HLA-A2拘束

性の腫瘍拒絶抗原ペプチド13種類を使い、それぞれにHLAの合致した膵がん患者に対して末梢血で各症例によって異なったペプチドに対するCTL誘導を検討した。現在までのところHLA-A24膵がん患者9例、HLA-A2膵がん患者4例に対してこの簡便法assay(新細胞性免疫定性法)を行い、各々2~3名の患者毎に異なったペプチドに対するCTL誘導が確認された。またCr-releasing assayによりHLA拘束性、ペプチド特異性の細胞傷害活性も確認した。

MUC1ペプチドワクチンの第I相試験では、現在4例に施行されており、毒性は全く認めていない。また、フローサイトメトリーの検討ではTh2有意に傾くことが観察された。1例において腫瘍マーカーの増加が抑制された結果を得ており、目標10例に向かって症例を重ねている。

D. 考察

膵がん切除例におけるMUC1-CTLを用いた細胞療法では良好な結果を得た。すなわち、肝転移再発が完全に防止できたことである。これにより、膵がん術後の短期再発死亡例は殆どなくなり、1年生存率90%と良好な結果を得た。問題点は、局所再発であり、これに対しては拡大郭清と術中放射線療法の線量増加により現在症例を重ね検討中である。免疫療法を補助療法の主軸とする効果が今後期待される。

膵がん切除不能例ではDCによる細胞療法を施行している。これはMUC1-CTLのみでは肝転移巣の縮小効果が得られなかったことによる。2例ではあるが1

例にlong NCを観察しており、今後症例を重ねていきたい。

上記、in vitroによるペプチド判定試験が完成したことから、患者個々にあったペプチドの選択が可能となった。これにより、evidenceに基づいたペプチド療法が可能となったと考えている。今後の計画として、倫理審査委員会での審査を経て、承認を得た後、厳格なインフォームドコンセントを取得した上、膵がん切除不能例を対象に、がん退縮抗原ペプチドを不完全フロイドアジュバントと混合してエマルジョン化し皮下投与し、その毒性と安全性について検討する第I相試験を開始する。

MUC1ペプチドワクチンの第I相試験ではその安全性が確認されつつある。second pointとして患者の免疫反応を検討した。その結果、Th2の分画がワクチン投与後に増加することが観察された。他のワクチン療法でも同様の報告があり、少なくともMUC1ペプチドを投与することにより患者の免疫動態は変化することが確認された。また、1例ではあるが腫瘍マーカーの増加が抑えられたことは興味深い。

E. 結論

膵がん切除例では、MUC1-CTLを用いた細胞療法は肝転移再発に有効であり、膵がんの予後改善に寄与することが予想される。また、切除不能膵がん、特に肝転移を伴う症例ではDCを用いた細胞療法を行いその効果を検討中である。ペプチドワクチン療法では、MUC1ペプチドとがん退縮抗原ペプチドによる第I相試験を施行あるいは計画している。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki N, Tanaka S, Maeda Y, Hida N, Mine T, Yamamoto K, Oka M, Itoh K. Detection of peptide-specific cytotoxic T lymphocyte precursors used for specific immunotherapy for pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, in press

2. Yoshimura K, Hazama S, Iizuka N, Yoshino S, Yamamoto K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Noma T, Oka M. Successful immunogene therapy using colon cancer cells (colon 26) transfected with plasmid vector containing mature interleukin-18 cDNA and Igk leader sequence. *Human Cancer Therapy*, in press.

3. Yamamoto K, Yahara N, Gondo T, Ishihara T, Oka M. Establishment and characterization of a new human pancreatic cancer cell line, YPK-1. *Bulltin Yamaguchi*, in press.

4. Yoshino S, Hamama S, Yoshimura K, Tabata T, Oka M. Immunoregulatory effects of the anticancer polysaccharide lentinan on Th1/Th2 balance in patients with digestive cancers. *Anticancer Research* 20: 4707-4712, 2000

5. Mori N, Oka M, Iizuka N, Yamamoto K, Yoshino S, Tangoku A, Noma T, Hirose K. Detection of telomerase activity in peritoneal

- lavage fluid from patients with gastric cancer using immunomagnetic beads. British Journal of Cancer 83(8): 1026-1032, 2000
- 6. Iizuka N, Miyamoto K, Tangoku A, Hayashi H, Hazama S, Yoshino S, Hirose K, Yoshida H, Oka M. Down regulation of intracellular nm23-H1 prevents cisplatin-induced DNA damage in oesophageal cancer cells: possible association with Na⁺, K⁺-ATPase. British Journal of Cancer 83(9): 1209-1215, 2000
- 7. Ohno R, Yamaguchi Y, Toge T, Kinouchi T, Kotake T, Shibata M, Kiyohara Y, Ikeda S, Fukui I, Gohchi A, Sugiyama Y, Saji S, Hazama S, Oka M, Ohnishi K, Ohhashi Y, Tsukagoshi S, Taguchi T. A dose-escalation and pharmacokinetic study of subcutaneously administered recombinant interleukin 12 and its biological effects in Japanese patients with advanced malignancies. Clinical Cancer Research 6: 2661-2669, 2000

2. 学会発表

1. 山本光太郎、矢原 昇、岡正朗. 膵癌に対する養子免疫療法の実績. 第59回日本癌学会総会、2000、10月
2. 山本光太郎、矢原 昇、岡正朗. 養子免疫療法を併用した膵癌治療の実績. 第31回日本膵臓学会、2000、10月

3. 山本光太郎、矢原 昇、岡正朗. MUC1-CTL養子免疫療法を併用した膵癌集学的治療の実績. 第13回日本バイオセラピー学会、2000、12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

がん抗原ペプチドの合成に関する研究
(分担) 研究者 望月 徹 静岡県立大学薬学部助教授

研究要旨 Mucin は、難治がんである膵がんおよび大腸がんをはじめ、腺がん、肺がんおよび子宮がん等で産生される分子量約122KD の糖蛋白であり、分子内の2/3 は 20 アミノ酸残基からなる MUC1 ペプチド配列の繰り返しで占められている。このMUC1 は細胞障害性 T リンパ球誘導活性を有することからがん抗原ペプチドと考えられている。しかしながらその活性は弱く、がん免疫療法における十分な臨床的効果は得られていない。本研究は、非天然型MUC1 ポリマーを設計し、合成化学的手法により臨床応用が可能な高抗原性MUC1 誘導体の開発を目指したもある。

A. 研究目的

臨床応用に可能な高抗原性ペプチドの合成化学的手法による開発を目的とした。本研究では先ず、がん細胞産生蛋白の一つである Mucin 分子内のがん抗原ペプチドである MUC1 に着目し、高抗原性が期待できる非天然型のMUC1 並列 dimer, trimer, tetramerおよび pentamer の化学合成を検討した。

B. 研究方法

ペプチドの化学合成は、Boc-アミノ酸誘導体を用いる固相法で行ったが、分子量 1 万以上のペプチドの化学合成は報告も少なく従来の方法では困難が予想されることから、縮合反応に用いるBoc-アミノ酸は出発物質の 4 倍等量用い、縮合試薬は最近開発された 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU) を用いることとした。すなわち、先ず、Ac-Lys-Gly-Lys-Resin, Ac-Lys-Gly-Lys-Gly-Lys-Resin, Ac-Lys-Gly-Lys-Gly-Lys-Gly-Lys-Resin および Ac-Lys-Gly-Lys-Gly-Lys-Gly-Lys-Gly-Lys-Resin を調製した。ついで、各 Lys 残基側鎖の ε-アミノ基上に 20 アミノ酸残基のMUC1 一次構造に従い、そのC末端アミノ酸から順次TBTU を縮合剤として導入しペプチド鎖を延長した。最終縮合反応完結後得られた保護ペプチド樹脂は、anisol 存在下液体 HF で 0℃, 60 分攪拌処理しペプチドを樹脂から解離し、同時に全ての側鎖保護基を除去後3M 酢酸で抽出、凍結乾燥して粗製ペプチドを得た。粗製ペプチドは 3M 酢酸を溶出液とする Sephadex G-50 カラム(3 x140 cm)

を用いてゲル濾過し、次いで C18 またはC8 分取用カラム(2x25cm) を用い、0.01N HCl/CH₃CN 混合溶媒を溶離液とする逆相 HPLC で精製した。

C. 研究結果

精製して得られた MUC1 並列型 dimer, trimer, tetramer および pentamerはいずれも酸分解物のアミノ酸分析および Tof-質量分析において理論値に一致する分析値を与えた。

さらに分析用逆相 HPLC では単一の鋭いピークとして溶出され、精製ペプチドが目的とする構造を有する高純度単一物質であることを証明した。精製ペプチドの収率は粗製ペプチドから計算して20-30% であり、いずれも細胞障害性 T リンパ球誘導作用の検討に十分な100mg 以上の収量であった。

以下に本研究で得られた合成ペプチドのアミノ酸分析および Tof-質量分析の結果を示す。

Amino acid ratios in acid hydrolysate (6N HCl, 110℃, 24hr)

Dimer : Asp(2)1.93 Thr(6)5.54 Ser(4)3.47
Gly(5)5.04 Ala(8)8.02 Val(2)2.12 Lys(2)
2.04 His(2)1.96 Arg(2)2.03 Pro(10)10.37
Trimer : Asp(3)2.92 Thr(9)8.36 Ser(6)5.31
Gly(8)8.25 Ala(12)12.20 Val(3)3.15
Lys(3) 3.25 His(3)3.07 Arg(3)3.03
Pro(15)15.50
Tetramer : Asp(4)3.88 Thr(12)11.69 Ser(8)
7.58 Gly(11)11.42 Ala(16)16.07 Val(4)
4.11 Lys(4)4.32 His(4)4.01 Arg(4)4.12
Pro(20)20.97

Pentamer : Asp(5)4.86 Thr(15)14.80 Ser
(10)9.64 Gly(14)14.44 Ala(20)19.92
Val(5)5.16 Lys(5)5.49 His(5)5.06 Arg
(5)5.01 Pro(25)25.82

Tof-mass

Dimer : C176H281N55O59 (4111.53)

M/Z : 4112

Trimer : C264H421N83O88 (6165.80)

M/Z : 6166

Tetramer : C352H561N111O117 (8220.07)

M/Z : 8221

Pentamer : C440H701N139O146 (10274.34)

M/Z : 10275

D. 考察

本研究では、従来の方法では化学合成が困難であるとされた高分子ペプチドを並列型ポリマーとして設計し化学合成を検討した。その結果、分子量 4111, 6165, 8220 および 10274 の高分子ペプチドを高収率で得ることに成功し、採用した合成法および精製法が適切であったことが示された。

E. 結論

本研究では、がん免疫療法において臨床的応用が可能な高抗原性がん抗原ペプチドの合成化学的手法による開発を目指し、先ず Mucin の抗原ペプチドである MUC1 に着目してその非天然型並列ポリマーを 4 種類設計し化学合成を検討した。その結果、従来困難とされた分子量 1 万以上の高分子ペプチドを高収率で合成することに成功した。本研究で合成した並列 MUC1 ポリマーは、高分子量でありかつ非天然型分子型を有することから高抗原的であることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kodaira, T., Kato, I., Li, J., Mochizuki, T., Usuki, Y., Oguri, H. and Yanaihara, N. : Novel ELISA for the measurement of immunoreactive Bisphenol A. Biomed. Res., 21(2) : 117-121, 2000

2. Ogata, M., Kajiyama, F., Iguchi, K., Mochizuki, T. and Hoshino, M. : Production and secretion of galanin-related peptides in human small cell lung carcinoma. Peptide Science, 1999. (ed. N. Fujii), The Japanese Peptide Society, 213-216, 2000

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

平成12年度 分担研究報告書

プロスタグランジンによる抗腫瘍性免疫応答誘導の研究

分担研究者 福島雅典 京都大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

臨床評価を行うべき段階にある抗腫瘍性PG、15-deoxy- Δ^7 -PGA1-Meリピッドミクロスフェア製剤（Lipo-TEI-9826）の臨床応用範囲を拡大するために同剤のp53を模す作用機構に着目して腫瘍内単回投与の効果ならびにシスプラチンとの併用効果を検討した。直径約7~8mmまで成長したマウス皮下移植Colon26腫瘍は同剤40mg/kgの腫瘍内単回投与により腫瘍成長は有意に抑制され、6例中2例で腫瘍は消失し、持続的抗腫瘍効果が実証された。また、同上剤80mg/kg皮下投与24時間後にシスプラチン1mgまたは2mg/kg腹腔内投与を併用する治療を4日毎に4回行ったところ、腫瘍成長は著しく抑制され投与終了1週間後の腫瘍体積は対照の1/5に止まった。以上Lipo-TEI-9826の腫瘍内投与により確実に腫瘍を抑制できること、適切な投与スケジュール下ではシスプラチンとの併用効果が得られることが実証された。

A. 研究目的

これまでの研究で開発された臨床使用可能な製剤である抗腫瘍性PG製剤Lipo-TEI-9826の担癌生体の免疫応答への影響を明らかにして、同剤の臨床応用範囲を拡大し、同剤の生物的応答修飾薬としての治療学的意義を確立する。

B. 研究方法

担癌生体の免疫応答への影響を明らかにして抗腫瘍性PGの臨床応用範囲を拡大するための基礎的検討として以下の実験を行った。

Lipo-TEI-9826は*in vitro*では5-FU、シスプラチン、エトポシド、アドリアマイシン等臨床で広く用いられる抗腫瘍薬と併用効果を示す。マウスおよびラットの担癌モデルを用いて*in vivo*でのシスプラチンとの併用効果を検討した。直径7~8mmに成長したマウス皮下移植Colon26腫瘍をLipo-TEI-9826 80mg/kgを4日に一回腫瘍反対側に皮下投与し、その24時間後にシスプラチン1mg/kg、2mg/kgを腹腔内投与し、4コース治療した。

抗腫瘍性PGは腫瘍細胞においてP53を模す作用を起こし、細胞周期G1停止、アポトーシスを導く。P53による遺伝子治療が試みられているが、抗腫瘍性PGの作用機構か

らみて腫瘍内投与(i.t.)は検討の余地があった。そこで、Colon26細胞 1×10^6 個をマウス右側腹部皮下に移植し、(day0)、直径5mm程度(3.5-8mm)まで腫瘍が成長したday11にLipo-TEI-9826を20、40mg/kgおよびControl Lipoをそれぞれ単回i.t.投与して、経時的に腫瘍径を計測した。

C. 研究結果

Lipo-TEI-9826とシスプラチンの24時間差併用投与期間中から有意に腫瘍成長は抑制され、その効果は投与終了後も少なくとも一週間以上持続した。d27における腫瘍体積は対照2700mm³に対して併用群では500mm³と約1/5に止まった。この治療条件下では体重減少等毒性は認められなかった。

Lipo-TEI-9826は適切な投与スケジュール下ではシスプラチンとの併用効果を有することが明らかであった。

d11にLipo-TEI-9826を単回腫瘍内投与したところ、d18、d22で、20mg/kg、40mg/kg両投与群において有意に腫瘍成長は抑制されており、40mg/kgでは6例中2例で腫瘍が消失した。うち、1例はd22以後再発し、他はd29以後に再発した。

このような持続的増殖抑制は注目され、肝癌にたいするPEITと同様に臨床的応用が可能である。

D. 考察

腫瘍内投与によって腫瘍消失が得られたことは、肝癌に対するエタノール注入と同様な臨床的使用の可能性を示唆している。腫瘍内注入は簡便かつ安全な臨床的評価方法として検討に値する。また、低用量シスプラチンとの併用効果が実証されたので腫瘍内投与方法と合わせて合理的な臨床試験デザインが可能となった。

E. 結論

すでに臨床使用可能な製剤である抗腫瘍性PG、製剤Lipo-TEI-9826はマウス皮下移植腫瘍Colon26に対して皮下単回投与によって確実にその成長を抑制でき、適切な投与スケジュール下ではシスプラチンとの併用効果が得られた。

F. 健康危険情報

通常のマウス皮下移植腫瘍の治療実験であり、ヒトの健康へのリスクは無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukushima, S., Takeuchi, Y., Kishimoto, S., Yamashita, S., Uetsuki, K., Shirakawa, S., Sawada, J., Kojima, M., Suzuki, M., Furuta, K., Noyori, R., Sasaki, H., Kikuchi, Y., Kita, T., Yamori, T., Hazato, A., Kurozumi, S., Fukushima, M. : Antitumor Activity, Optimum Administration Method and Pharmacokinetics of 13, 14-Dihydro-15-deoxy- Δ 7-prostaglandin A1 methyl ester (TEI-9826) Intergrated in Lipid Microspheres (Lipo TEI 9826)1. *Anti-Cancer Drugs*, 12, 2001.(in press)
2. Fukushima, S., Kishimoto, S., Takeuchi, Y., Fukushima, M. : Preparation and evaluation of o/w type emulsions containing antitumor prostaglandin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45: 65-75, 2000.

2. 学会発表

1. 福島昭二、白川悟史、藤原融子、時松美乃、岸本修一、竹内由和、澤田純一、清水直明、賀川義之、小島康生、黒住精二、福島雅典：抗腫瘍性プロスタグランジン含有脂肪乳剤(Lipo TEI-9836)とシスプラチンとの併用によるin vivo抗腫瘍効果. 日本癌学会総会記事. p 393. 2000