

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-20487

(P2004-20487A)

(43) 公開日 平成16年1月22日(2004.1.22)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/53

K

GO 1 N 33/15

GO 1 N 33/15

Z

GO 1 N 33/50

GO 1 N 33/50

Z

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2002-178590 (P2002-178590)

(22) 出願日 平成14年6月19日 (2002.6.19)

(71) 出願人 300040380

株式会社オリエントキャンサーセラピー

東京都三鷹市大沢 1-1-2 1

(74) 代理人 100088904

弁理士 庄司 隆

(72) 発明者 八木田 旭邦

東京都三鷹市大沢 1 丁目 1 番 2 1 号

(54) 【発明の名称】 ガンの検査法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、新免疫療法においてDC意義を見出すことによって、新免疫療法の完成を課題とする。

【課題解決手段】白血球中のDC（樹状細胞）のDC1〔CD11c（+）〕を測定し、マーカーとするガンの検査手段、DC1とIL-12誘導量又はIFN γ の相関を検査する前項1のガンの検査手段、白血球中のDC（樹状細胞）のDC2〔CD11c（-）〕をも測定し、DC1／DC2比を検定し、マーカーとする前項1のガンの検査手段、ガンの免疫治療剤のスクリーニング方法であって、DC1を検定し又はDC1／DC2比を検定し、DC1優位をもって有効と判定するガンの免疫治療剤のスクリーニング方法を提供した。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

白血球中の DC（樹状細胞）の DC 1 [CD 1 1 c (+)] を測定し、マーカーとするガンの検査手段。

【請求項 2】

DC 1 と IL-1 2 誘導量又は IFN γ の相関を検査する請求項 1 のガンの検査手段。

【請求項 3】

白血球中の DC（樹状細胞）の DC 2 [CD 1 1 c (-)] をも測定し、DC 1 / DC 2 比を検定し、マーカーとする請求項 1 のガンの検査手段。

【請求項 4】

ガンの免疫治療剤のスクリーニング方法であって、DC 1 を検定し又は DC 1 / DC 2 比を検定し、DC 1 優位をもって有効と判定するガンの免疫治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 5】

請求項 1～3 の何れかーに記載の情報を自然法則を利用した媒体に担持した商業用媒体。

【請求項 6】

請求項 5 の商業用媒体を利用した商業方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、新免疫療法のための新規な手段の提供に関する。特に、白血球中の DC（樹状細胞）をマーカーにした癌治療における又は癌治療剤の有効性の判定のための手段を提供する。

【0002】

【従来の技術】

ガン (malignant neoplasms) (cancer) の予防または治療のために有用な物質の選別には、従来、ガン細胞へのその直接的作用が重要視されていた。免疫賦活剤がガン治療に有用であることは認められていたが、免疫賦活剤として得られた化合物はいずれもその抗ガン効果が微弱であり、免疫療法単独または化学療法との併用治療によってもガンの十分な治療効果は達成されていない。

【0003】

本発明者の医学博士、八木田は、先にガン治療における画期的な手法として、インターロイキン 1 2 (IL-1 2) を生体内で誘発する物質の有用性に着目し、キノコ菌糸体加工物がその機能を有することを発見し、新免疫療法 (Novel Immunotherapy for cancer) (NITC) ともいうべきガン治療法を確立した。従来 IL-1 2 は、抗ガン効果があるものの生体内に IL-1 2 自体を直接投与した場合には副作用を生じるために患者が治療に耐えられないという事実があり、それ自体を抗ガン剤として使用できなかった。しかし、八木田が報告したキノコ菌糸体加工物を含む製剤は、ガンの治療において著しい治癒・延命効果を達成した。つまり八木田は、IL-1 2 を生体内で誘発できる有効量のキノコ菌糸体加工物を投与することにより、ガンの治療目的を達成した（特開平 10-139670 号公報）。

【0004】

IL-1 2 は、TNF α $\rightarrow$ IFN γ $\rightarrow$ IL-1 2 $\rightarrow$ CTL 活性というルートでキラー T 細胞の活性化効果と増強効果をもつ。つまり IL-1 2 の産生増強は、キラー T 細胞の活性化と増強により抗ガン効果が期待される。

【0005】

八木田は、IL-1 2 の産生増強の系とは別に NK T 細胞の活性化が抗ガン効果に有用であることを報告している。谷口等は、NK T 細胞が有する V α 2 4 V β 1 1 という特異的な T 細胞抗原受容体 (TCR) が認識する特異的な糖脂質抗原を発見し、この抗原が、 α ガラクトシルセラミドであることを報告している。更に、 α ガラクトシルセラミドを投与した担ガンマウスでは、NK T 細胞が活性化され、ガンの消失はみられないものの転移が

10

20

30

40

50

抑制されることを証明した。

NK T細胞には、もう一つの受容体としてNK細胞抗原受容体（NK R-P 1；ナチュラルキラー受容体 P 1）があることは報告されている（特集 NK T細胞の基礎と臨床：最新医学 55 巻 4 号 2000 年 8 18～8 23 ページ）。NK R-P 1 も NK T細胞の活性化に参与し、この活性化が抗ガン効果がより優位であることを八木田は見出している。

【0006】

NK細胞についても生体の抗ガン作用に係わるという報告がなされているが、これまでNK細胞の活性と臨床的な抗ガン効果とが相関せず、IL-12の産生誘発量とNK細胞の活性とが完全な逆相関を示すことが八木田により証明されており、ヒトにおける抗ガン作用についてのNK細胞の関与は疑問視されていた。

10

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新免疫療法において、CTL活性（IL-12の誘導産生能、IFN γ の誘導産生能）、NK T活性、NK活性、血管新生阻害作用〔-VEGF：VEGF（血管新生増生因子）の逆数（VEGF測定数値にマイナス1を掛けて算出したパラメーター数値）〕の測定に加えて、新たにDC（樹状細胞）をも測定し、その測定値を使い各測定結果の検定の意味するところを分析し、CTL活性、NK T活性、NK活性及び-VEGFに加えてDCのガン治療における意義を見出すことによって、新免疫療法の完成を課題とする。

【0008】

20

【課題を解決するための手段】

本発明は、DCの動態とガンへの効果には相関性が存在することを見出し、本発明からなる新免疫療法のあらたな手段を達成した。

【0009】

すなわち本発明は、

1. 白血球中のDC（樹状細胞）のDC1〔CD11c（+）〕を測定し、マーカーとするガンの検査手段。
2. DC1とIL-12誘導量又はIFN γ の相関を検査する前項1のガンの検査手段。
3. 白血球中のDC（樹状細胞）のDC2〔CD11c（-）〕をも測定し、DC1/DC2比を検定し、マーカーとする前項1のガンの検査手段。
4. ガンの免疫治療剤のスクリーニング方法であって、DC1を検定し又はDC1/DC2比を検定し、DC1優位をもって有効と判定するガンの免疫治療剤のスクリーニング方法。
5. 前項1～3の何れかーに記載の情報を自然法則を利用した媒体に担持した商業用媒体。
6. 前項5の商業用媒体を利用した商業方法。

30

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳しく説明するが、本明細書中で使用されている技術的および科学的用語は、別途定義されていない限り、本発明の属する技術分野において通常の知識を有する者により普通に理解される意味を持つ。

40

【0011】

本発明者の医学博士八木田のガン新免疫療法とは4つの異なる作用機序を組み合わせることからなる治療手段である。

第一の作用機序は、血管新生阻害物質（ベターシャーク）を投与してガンへの血流を障害してガン縮小をはかる方法である。これは血管内皮細胞増殖因子（VEGF）を測定することでその効果は判定が可能である。血管新生阻害作用はVEGF値のマイナス値（-VEGF）で評価できる。このVEGF値の代わりにFGF、HGFなどのその他の血管増殖因子を用いることも血管新生阻害能を評価することが可能である。またVEGFの替わ

50

りに血管新生阻害因子の正数値でもその評価が可能である（例えばエンドスタチン値）。

【0012】

他の一つの作用機序は、 $\beta 1, 3$ グルカン構造を担持する化合物を投与してT h 1 サイトカイン（T N F α 、I F N γ 、I L - 1 2）を誘導してC T Lを活性化する方法である。C T L活性はC D 8（+）パーフォリン産生能力で判定が可能であるが、このC D 8（+）パーフォリン値には細胞障害性T細胞（C T L）と免疫抑制性T細胞（S T C； S u p p r e s s o r T c e l l）とがあり、前者はガン細胞を障害し、後者はガンの増殖に作用する。したがってその絶対値では評価はできない。しかし前者はI F N γ が10 I U / m l以上もしくはI L - 1 2値が7 . 8 p g / m l以上であればC T Lであり、I F N γ とI L - 1 2が低値であればS T Cと判定される。そこでC T L活性は、I F N γ 産生能力（I F N γ 値）もしくはI L - 1 2産生能力（I L - 1 2値）で評価が可能である。 10

【0013】

第三及び第四の作用機序である $\alpha 1, 3$ グルカン構造を担持する化合物の投与によって活性化されるe f f e c t o r細胞はN K細胞とN K T細胞である。このN KとN K T細胞とはN K R - P 1（N K細胞受容体C D 1 6 1（+））を共有しており、前者はC D 3（-）C D 1 6 1（+）の表面マーカーでN K細胞数は測定可能であり、その活性化はC D 3（-）C D 1 6 1（+）パーフォリン産生能力で判定が可能である。一方後者のN K T細胞はC D 3（+）C D 1 6 1（+）でその細胞数は測定が可能となり、そのパーフォリン産生能力でN K T細胞の活性化は測定可能である。 20

【0014】

したがってガン治療における新免疫療法（N I T C）であっても一般的な免疫療法であっても以下の測定項目でそれぞれのe f f e c t o r細胞もしくは血管新生阻害作用を評価することが可能である。具体的には、C T L活性はI F N γ あるいはI L - 1 2の誘導産生能力で評価が可能である。N K細胞の活性化はC D 3（-）C D 1 6 1（+）もしくはC D 3（-）C D 1 6 1（+）パーフォリン値でも評価可能である。N K T細胞の活性化はC D 3（+）C D 1 6 1（+）もしくはC D 3（+）C D 1 6 1（+）パーフォリン値でも評価が可能である。

【0015】

本発明は、臨床における結果と、N K細胞の活性化能、N K T細胞の活性化能、血管新生阻害能、I L - 1 2の誘導産生能、及びI F N γ の誘導産生能の相関性に加えて、D C（樹状細胞）動態を検討することにより行われた。本発明者は、新免疫療法（N I T C）として、ガン患者に $\alpha 1, 3$ グルカン構造を担持する化合物、 $\beta 1, 3$ グルカン構造を担持する化合物と血管新生阻害作用物質（サメ軟骨）を併用し、I L - 1 2、I F N γ 他の各種サイトカイン、D Cを測定した。その結果、D C 1〔C D 1 1 c（+）〕、D C 2〔C D 1 1 c（-）〕を測定し、又そのD C 1 / D C 2比を検定し、マーカーとすることはガンの検査手段として意義があることを見出した。 30

【0016】

この意義を見出したことによりD C 1〔C D 1 1 c（+）〕、D C 2〔C D 1 1 c（-）〕の測定は、有用なC T L活性化剤のスクリーニング方法に適用可能であり、このスクリーニング方法を利用すればC T L活性化能を担持する新規 $\beta 1, 3$ グルカンの特定が可能であることも見出した。本発明では、 $\beta 1, 3$ グルカン構造を持つ茸菌糸体組成物製剤（例えばI L X、I L Y：東西医薬品）が、C D 8 - パーフォリン産生能の測定を組み合わせれば当業者は容易にC T L活性化剤を特定可能である。 40

【0017】

以上のような情報は、自然法則を利用した媒体に担持すれば有用な商業用媒体となり、またその商業用媒体は有用な商業方法を提供する。

【0018】

本発明においてC T L活性化剤（I L - 1 2産生誘導剤、I N F γ 産生誘導剤）は、本発明の測定法による結果を指標として、その活性化を誘導または増強し、さらに活性化を維 50

持できる処方にて用いられる。すなわち、指標をもとに、その活性化を誘導または増強し、さらに活性化を維持できる投与量、ならびに投与期間を選択して用いられる。具体的には、その投与量は、CTL活性化剤（IL-12産生誘導剤、INF γ 産生誘導剤）である β -1, 3グルカン構造を持つ化合物は1g~10g/日程度、好ましくは3g~6g/日程度である。また、投与期間は一般的には10日間~24ヶ月間、投与頻度は1~3回/日で、好ましくは連日投与である。当該CTL活性化剤（IL-12産生誘導剤、INF γ 産生誘導剤）は、好適には経口摂取される。無論、投与量を減少させ、これらを非経口に耐え得る品質に調製することで、非経口摂取（静脈内または筋肉内投与などを含む）も可能である。

【0019】

10

細胞および各サイトカインの測定方法を以下に例示する。

DC（樹状細胞）の測定は、全白血球の中からDC（樹状細胞）を選択する目的で、HLA-DR（+）でCocktail（-）[CD3（-）、CD14（-）、CD16（-）、CD19（-）、CD20（-）、CD56（-）]の細胞にゲートをかける。さらに、この細胞集団の中で（A）DC1：CD11c（+）と（B）DC2：CD11c（-）とに分ける。（図1）にその詳細を提示した。何れも既知繁用手段によった。

【0020】

実施例ではガン患者の血液を用いて、血中細胞について細胞表面抗原であるCD11cについて陽性・陰性で区別し、各細胞の割合を、フローサイトメトリーを用いたTwo Color検査により常法通り測定した。

20

【0021】

（サイトカインを測定するための試料の調製）

まず、血液より単核球画分を分離調製する。ヘパリン加末梢血をリン酸緩衝生理食塩水（Phosphate Buffered Saline）（PBS）で2倍に希釈して混和した後、Ficoll-Conray液（比重1.077）上に重層し、400Gで20分間遠沈後、単核球画分を採取する。洗浄後、10%牛胎児血清（FBS）を加えたRPMI-1640培地を加え、細胞数を 1×10^6 個となるように調製する。得られた細胞浮遊液200 μ lにフィトヘマグルチニン（Phytohemagglutinin）（DIFCO社製）を20 μ g/mlの濃度となるように加え、96穴マイクロプレートにて5%CO₂存在下、37℃で24時間培養し、該培養した細胞溶液中のサイトカインを測定する試料とする。

30

【0022】

（IL-12の測定）

IL-12量の測定は自体公知の臨床、生化学的検査を利用できるが、R&D SYSTEMS社やMBL社より入手することのできる酵素免疫測定法（ELISA）による測定キットが使用される。ここではR&D SYSTEMS社の測定キットを用いた。実際には96穴マイクロプレートの各穴に測定用希釈液Assay Diluent RD1Fを50 μ l、標準液（standard）または実施例1で調製した試料を200 μ lずつ分注した後、室温にて静置して2時間反応させた。その後、西洋わさびパーオキシダーゼ（horse radish peroxidase）（HRP）標識抗IL-12抗体を200 μ lずつ分注し2時間室温で静置した。各穴の反応液を除去し3回洗浄後、発色基質溶液を200 μ lずつ分注し、20分間室温静置後、酵素反応停止溶液を50 μ lずつ分注した。550nmを対照として450nmにおける各穴の吸光度をE_{max}（和光純薬株式会社製）にて測定した。IL-12量は、pg/mlとして表される。ここでIL-12産生誘発能とは、末梢血単核球画分が刺激により産生するIL-12量を、7.8pg/ml以上に増強せしめる機能、またはある物質を投与する前のIL-12産生量より増強せしめる機能を意味する。

40

【0023】

（INF γ の測定）

INF γ の測定は、BioSource Europe S.社のINF γ EASIA

50

キットを用いて、酵素免疫測定法（E I A法）で測定した。実際には96穴マイクロプレートの各穴に標準液（s t a n d a r d）または上記調製した試料を2倍希釈したものを50 μ l ずつ分注し、HRP標識抗I F N γ 抗体を50 μ l ずつ分注し更に振盪しながら2時間室温で反応させた。各穴の反応液を除去し3回洗浄後、発色基質溶液を200 μ l ずつ分注し、振盪しながら15分間室温で反応させ、酵素反応停止溶液を50 μ l ずつ分注した。630nmを対照として450nmおよび490nmにおける各穴の吸光度をE m a x（和光純薬株式会社製）にて測定した。I F N γ 量は、I U / m l として表される。

【0024】

【実施例】

以下に、実施例を用いて本発明を具体的に説明するが、本発明は本実施例に限定されるものではない。

【0025】

【実施例1】

患者には、I L - X（東西医薬）、さめ軟骨（セイシン企業）、及び α 1, 3構造をもつ糖類が、各推奨処方により投与された。処置患者群の有効例（C R / 完治、P R / 部分治癒、L N C / 長期ガン増殖無）と無効例（S N C / 短期ガン増殖無、P D / 無効）で、I L - 12の誘導産生能、I F N γ 誘導産生能、及びD C 1〔C D 11c（+）〕、D C 2〔C D 11c（-）〕の寄与の関係を分析した。

【0026】

図2はD C 1とI L - 12の関係を示し、有効例及び無効例のいずれとも正の相関を示す。図3はD C 1とI F N γ の関係を示し、有効例及び無効例のいずれとも正の相関を示す。図4はD C 1 / D C 2比とI F N γ の関係を示し、有効例で正の相関を示し、無効例で逆相関を示した。また、D C 1 / D C 2比とI L - 12の関係でも、有効例で正の相関を示し、無効例で逆相関を示した。

【0027】

【発明の効果】

以上の結果によれば、D C 1、D C 2及びD C 1 / D C 2比は、癌治療におけるマーカーとして有用であり、新規な意義を提供するものであり、ガン治療における画期的な成果を達成した。

【図面の簡単な説明】

【図1】D C分離法の説明図。

【図2】D C 1とI L - 12の相関図。

【図3】D C 1とI F N γ の相関図。

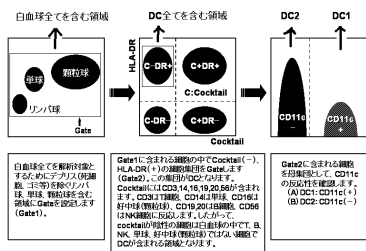
【図4】D C 1 / D C 2比とI F N γ の相関図

10

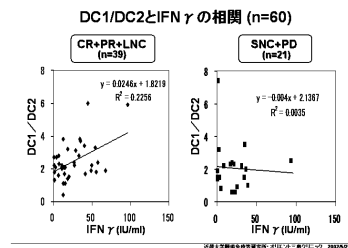
20

30

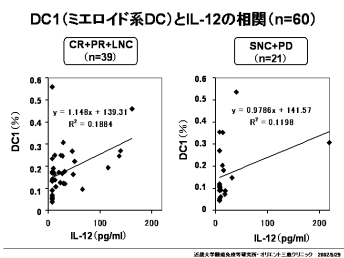
【図 1】



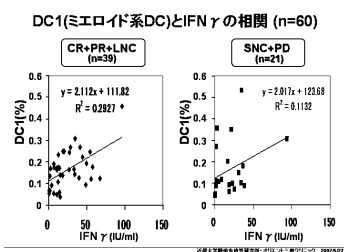
【図 4】



【図 2】



【図 3】



专利名称(译)	癌症的检查方法		
公开(公告)号	JP2004020487A	公开(公告)日	2004-01-22
申请号	JP2002178590	申请日	2002-06-19
申请(专利权)人(译)	有限公司东方癌症治疗		
[标]发明人	八木田旭邦		
发明人	八木田 旭邦		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/15 G01N33/50		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/15.Z G01N33/50.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CA19 2G045/DA80		
代理人(译)	庄司隆		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通过新的免疫疗法中发现DC的重要性来完成新的免疫疗法。 解决方案：测量白细胞中DC（树突状细胞）的DC1 [CD11c（+）]，并使用癌症检测手段作为标记物，并检查DC1与IL-12诱导量或IFN γ 之间的相关性。 以上1中描述的癌症测试方法，还测量白细胞中DC（树突状细胞）的DC2 [CD11c（-）]，并测定DC1 / DC2比。 提供了一种筛选治疗剂的方法，该方法是筛选用于癌症的免疫治疗剂的方法，其中测定DC1 / DC1 / DC1 / DC2的比例，并且主要确定DC1是有效的。

【 図 4 】

