

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年6月16日 (16.06.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/054496 A1

- (51) 国際特許分類: C12Q 1/02, (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, G01N 33/574, A61P 35/00, A61K 31/715
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/017843
- (22) 国際出願日: 2004年12月1日 (01.12.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2003-403676 2003年12月2日 (02.12.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社オリエントキャンサーセラピー (ORIENT CANCER THERAPY CO.,LTD.) [JP/JP]; 〒1810015 東京都三鷹市大沢1丁目1番21号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 八木田 旭邦 (YAGITA, Akikuni) [JP/JP]; 〒1810015 東京都三鷹市大沢1丁目1番21号 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 庄司 隆 (SHOJI, Takashi); 〒1010032 東京都千代田区岩本町3丁目2番10号 SN岩本町ビル6階 Tokyo (JP).
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF EXAMINING CELL KINETICS

(54) 発明の名称: 細胞動態の検査方法

(57) Abstract: It is intended to achieve an improved efficacy of a molecule-targeting therapeutic drug by providing a means for elevating a complete remission ratio, shortening the period requiring for complete remission and establishing synergistic effects with an immunotherapy. That is to say, it is intended to achieve synergistic effects by the combined use of a novel immunotherapy focusing on CTL activity, NKT activity, NK activity, VEGF, etc. with a molecule-targeting therapeutic drug, in particular, a tyrosine kinase inhibitor. It is found out that a key factor resides in an immunological therapeutic drug such as an IL-12 production inducer efficaciously affecting perforin-producing cells. Namely, a method of examining an immunotherapy for cancer by using the kinetics of perforin-producing cells as a marker and an immunological therapeutic drug for cancer which is screened by using the kinetics as a marker.

(57) 要約: 本発明は、分子標的治療薬のより有効な効果をもたらすことを目的とし、完全寛解率を上げ、完全寛解への期間の短縮化を達成し、免疫療法との相乗効果を達成するための手段を提供するものである。つまり、CTL活性、NKT活性、NK活性及びVEGF等に注目する新免疫療法と分子標的治療薬特にチロシンキナーゼ阻害剤との併用による相乗効果の達成を課題とする。IL-12産生誘導剤のような免疫療法剤が、パーフォリン産生細胞に有効に影響するものであることが重要であることを見出したことによる。すなわち、パーフォリン産生細胞の動態をマーカーとする癌免疫療法の検査方法、及び該動態をマーカーとしてスクリーニングされた癌免疫療法剤による。

WO 2005/054496 A1

明 細 書

細胞動態の検査方法

技術分野

- [0001] 本発明は、癌治療の新たな領域を提供するものである。すなわち、新規な癌治療法として着目されるチロシンキナーゼ阻害剤と、医学博士八木田旭邦が開発したNK細胞の活性化能、NKT細胞の活性化能、血管新生阻害能、IL-12の産生誘導能及びIFN γ の産生誘導能の動態に着目した新免疫療法との併用において、パーフォリン産生細胞の動態に着目した新規な癌免疫療法の検査方法及び癌免疫療法剤の提供に関する。
- [0002] 本出願は、参照によりここに援用されるところの、日本特許出願特願2003-403676号からの優先権を請求する。

背景技術

- [0003] ガン(malignant neoplasms)(cancer)の予防または治療のための有用な物質の選別は、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。
- [0004] 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12(IL-12)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とその機能を有することを発見し、新免疫療法(Novel Immunotherapy for cancer)(NITC)ともいべきガン治療法を確立した。従来IL-12は、抗ガン効果があるものの生体内にIL-12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-12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(特許文献1)。

- [0005] IL-12は、 $TNF\alpha \rightarrow IFN\gamma \rightarrow IL-12 \rightarrow CTL$ 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-12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を期待される。
- [0006] 八木田は、IL-12の産生増強の系とは別にNKT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、NKT細胞が有する $V\alpha 24V\beta 11$ 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、NKT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抑制されることを証明した。
- NKT細胞にはもう一つの受容体としてNK細胞抗原受容体(NKR-P1; ナチュラルキラー受容体P1)があることが報告されている(非特許文献1)。NKR-P1もNKT細胞の活性化に関与し、この活性化が抗ガン効果において、より優位であることを八木田は見出している(特許文献2)。
- [0007] ガンの分子標的治療剤は、新タイプの制癌剤として従来の細胞標的治療剤と対比してその意義が着目されている。そのなかでも特にシグナル伝達阻害作用を有する薬剤としてチロシンキナーゼ阻害剤が注目されている。ZD1839(イレッサ:登録商標 アストラゼネカ)はEGFR(上皮成長因子受容体)チロシンキナーゼのATP結合部位におけるATPとの競合作用を有し、チロシンキナーゼの自己リン酸化を抑制することでチロシンキナーゼ活性を抑制する。その結果、EGFRのもつ増殖、浸潤、分化、転移に関連するシグナル伝達[EGFRの細胞外ドメインに上皮成長因子(EGF)等のリガンドが結合することにより、細胞内ドメインにあるEGFRチロシンキナーゼが活性化し、EGFRの自己リン酸化および種々の細胞内標的たんぱくのリン酸化を引き起こすことにより細胞表面から核への増殖シグナルが伝達され、癌細胞表面から核への増殖シグナルが伝達され、癌細胞の増殖、浸潤、転移、血管新生を起こす]を遮断することにより抗癌作用を発現する。IMC-C225(EGFR標的モノクローナル抗体)は細胞膜表面のEGFRレセプター部分を認識し、EGFRの自己リン酸化を抑制することでチロシンキナーゼ活性を阻害する。ハーセプチンはEGFRと相同性をもつHer2/Neuに対するモノクローナル抗体であり、STI-571(グリベック)はBCR-Ablのチロシンキナーゼ活性

の阻害とc-kitのチロシンキナーゼ活性の阻害能を有する(非特許文献2)。

[0008] このような分子標的治療剤は新メカニズムのガン治療薬として着目されるが、その効果はいまだ革命的とはいえない。たとえば、ZD1839(イレッサ)はアストラゼネカ社が新規に開発した強力かつ選択的なEGFRチロシンキナーゼ阻害剤であり、ヒトでもその有用性が判明している。しかし非小細胞肺癌や前立腺癌などでの臨床成績はPR(部分寛解)が10〜20数%で、CR(完全寛解)は全くないと言ってもよいが、あっても極くまれで完全寛解まで4ヶ月以上の期間がかかっていた。そこでZA1839(イレッサ)と各種抗癌剤との併用療法が試みられているものの現時点では相加あるいは相乗効果は得られていない。

[0009] NK細胞からのIFN γ 産生を誘導するケモカインとしてCX3C-ケモカインが報告され、そのレセプターとしてCX3CR1があり、これはG蛋白共役7回膜貫通型レセプターでNK細胞や単球及び一部T細胞に発現している(非特許文献3)。西村等はT細胞におけるCX3CR1発現はCD3(+)/CD161(+)/とグランザイムB陽性細胞に限られ、細胞障害活性がCX3CR1陽性細胞によって担われていることを明らかにした(非特許文献4)。

[0010] 特許文献1:特開平10-139670号公報

特許文献2:US2002-0010149A1

非特許文献1:特集 NKT細胞の基礎と臨床:最新医学55巻4号2000年818〜823ページ

非特許文献2:血液・免疫・腫瘍 Vol. 7 No.3 2002-7

非特許文献3:Cell 1997;91:521

非特許文献4:J. Immunol 2002; 168: 6173

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は、上記のような分子標的治療薬のより有効な効果をもたらすことを目的とし、完全寛解率を上げ、完全寛解への期間の短縮化を達成し、免疫療法との相乗効果を達成するための手段を提供するものである。つまり、CTL活性、NKT活性、NK活性及びVEGF等に注目する新免疫療法と、分子標的治療薬、特にチロシンキナーゼ

阻害剤との併用による相乗効果の達成を課題とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明は、チロシンキナーゼ阻害剤と癌免疫療法剤の併用がガン治療における優位な相乗効果を達成するためには、癌免疫療法剤がパーフォリン産生細胞に有効に影響するものであることが重要であることを見出し本発明を完成した。

[0013] すなわち本発明は、

「1. チロシンキナーゼ阻害剤と癌免疫療法剤の併用において、癌免疫療法剤によるパーフォリン産生細胞の動態をマーカーにする細胞動態の検査方法。

2. チロシンキナーゼ阻害剤と癌免疫療法剤の併用において、癌免疫療法剤の有効性判定のためにパーフォリン産生細胞の動態をマーカーにする癌免疫療法剤。

3. チロシンキナーゼ阻害剤と癌免疫療法剤の併用において、癌免疫療法剤の有効性判定のためにパーフォリン産生細胞の動態をマーカーにする癌免疫療法剤のスクリーニング方法。

4. チロシンキナーゼ阻害剤が、以下の少なくとも1の受容体に対する選択的標的作用を有し、癌免疫療法剤の機能がIL-12産生誘導及び／又はIL-21介在反応である前項1又は3の方法。

HER2/neu、HER3、HER4、c-kit、PDGFR、bcr-abl、EGFR

5. チロシンキナーゼ阻害剤が、以下の少なくとも1の受容体に対する選択的標的作用を有し、癌免疫療法剤の機能がIL-12産生誘導及び／又はIL-21介在反応である前項2の癌免疫療法剤。

HER2/neu、HER3、HER4、c-kit、PDGFR、bcr-abl、EGFR

6. 癌免疫療法剤が、 β 1,3/1,6グルカン構造を有する物質である前項4の方法。

7. 癌免疫療法剤が、 β 1,3/1,6グルカン構造を有する物質である前項5の癌免疫療法剤。

8. 癌免疫療法剤が、 β 1,3/1,6グルカン構造を有する酵母由来成分である前項4の方法。

9. 癌免疫療法剤が、 β 1,3/1,6グルカン構造を有する酵母由来成分である前項5の癌免疫療法剤。

10. パーフォリン産生細胞の動態が、NKTP(+)値、NKT8(+)P(+)値、CD8(+)P(+)T値、及びTh1/Th2比のうちの少なくとも一により判定される前項1、3、4、6、及び8の何れか一の方法。

11. パーフォリン産生細胞の動態が、NKTP(+)値、NKT8(+)P(+)値、CD8(+)P(+)T値、及びTh1/Th2比のうちの少なくとも一により判定される前項2、5、7、及び9の何れか一の癌免疫療法剤。

12. ガンの化学療法剤及び放射線治療との併用無しに処置される前項2、5、7、9、及び11の何れか一の癌免疫療法剤。

13. NKT細胞のNKR-P1に選択的に作用してNKT細胞を活性化をおこす物質と併用される前項2、5、7、9、11、及び12の何れか一の癌免疫療法剤。

14. 血管新生阻害能を有する物質と併用される前項2、5、7、9、11、12及び13の何れか一の癌免疫療法剤。」

からなる。

発明の効果

[0014] 本発明では、免疫療法剤によるパーフォリン産生細胞の動態への影響をマーカーにすることの臨床的意義を見出し、これを測定すれば、より確実にチロシンキナーゼ阻害剤と免疫療法剤の併用による効果を達成可能である。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]免疫マーカーの寄与度について多変量解析図である。

[図2]各々のeffector細胞中のパーフォリン産生細胞の寄与度を検討した図である。

[図3]寄与度を比率で見た図である。

[図4]免疫学的factorの重要性を検討した図である。

[図5]免疫学的factorの重要性を検討した図である。

[図6]免疫学的factorの重要性を検討した図である。

[図7]NK細胞で検討した図である。

[図8]CD8(+)細胞で検討した図である。

[図9]肺腺癌における奏効への寄与(N=50)を示す図である。

[図10]肺腺癌(イレッサ投与後)における奏効への寄与(N=48)を示す図である。

[図11]肺腺癌(イレッサ投与後)における奏効率(N=30)を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0016] 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。

[0017] 本発明者の医学博士八木田のガン新免疫療法(NITC)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の判定が可能である。血管新生阻害作用はVEGF値のマイナス(負)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ても血管新生阻害能を評価することが可能である。またVEGFの代わ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)。

[0018] 第二の作用機序は、 β 1,3グルカン構造を担持する化合物を投与してTh1サイトカイン(TNF α 、IFN γ 、IL-12)を誘導してCTLを活性化する方法である。CTL活性はCD8(+)パーフォリン産生能力で判定が可能であるが、このCD8(+)パーフォリン値には細胞障害性T細胞(CTL)と免疫抑制性T細胞(STC; Suppressor T cell)とがあり、前者はガン細胞を障害し、後者の活性化は結果的にガンの増殖につながる。したがってその絶対値では評価はできない。しかし、IFN γ が10 IU/ml以上かもしくはIL-12値が7.8 pg/ml以上であればCTLであり、IFN γ とIL-12が低値であればSTCと判定される。そこでCTL活性は、IFN γ 産生能力(IFN γ 値)もしくはIL-12産生能力(IL-12値)で評価が可能である。

[0019] 第三及び第四の作用機序である α 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effector細胞はNK細胞とNKT細胞である。このNKとNKT細胞とはNKR-P1(NK細胞受容体CD161(+))を共有しており、前者について、CD3(-)CD161(+))の表面マーカーでNK細胞数は測定可能であり、その活性化はCD3(-)CD161(+))パーフォリン産生能力で判定が可能である。一方後者のNKT細胞はCD3(+))CD161(+))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(NKTP(+))と記す)でNKT細胞の活性化は測定可能である。

[0020] したがってガン治療において新免疫療法(NITC)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effector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、CTL活性はIFN γ あるいはIL-12の産生誘導能力で評価が可能である。NK細胞の活性化はCD3(-)CD161(+)で、もしくはCD3(-)CD161(+)パーフォリン値でも評価可能である。NKT細胞の活性化はCD3(+)-CD161(+)で、もしくはCD3(+)-CD161(+)パーフォリン値(NKTP値)でも評価が可能である。

[0021] 本発明は、上記の新免疫療法にチロシンキナーゼ阻害剤を併用することによる臨床における結果を検討することにより行われた。本発明者は、新免疫療法(NITC)として、ガン患者に α 1,3グルカン構造を担持する化合物、 β 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、IL-12、IFN γ 他の各種サイトカインを測定した。なお、CD8(+)パーフォリン産生は、IFN γ 及びIL-12の産生とは強い正の相関性が存在し、この結果、CD8(+)パーフォリン産生の測定はCTL活性ルーートの評価に意義があることを見出している。本発明では、新免疫療法にチロシンキナーゼ阻害剤を併用し、その有効患者の腫瘍細胞障害細胞の特定を行い、NKTP(+)[CD3(+)-CD161(+)パーフォリン(+)]、NKT8(+)-P(+)[CD3(+)-CD161(+)CD8(+)-パーフォリン(+)]、CD8(+)-P(+)[CD8(+)-パーフォリン(+)]T細胞、及びNKP(+)[CD3(-)-CD161(+)パーフォリン(+)]に強い寄与度を確認した。そして、IFN γ やIL-12では活性化されないが、Th1/Th2比に依存的であるeffector細胞の存在を確認した。この細胞はパーフォリンと非常に強い関連性をもち、本発明者はCX3CR1類似細胞であるとしてY細胞と仮称した。この細胞は、IL-21で活性化されるIL-21介在性反応に関連するものと推定された。

[0022] この意義により免疫療法剤とチロシンキナーゼ阻害剤の併用において、少なくともパーフォリン産生細胞の測定は、チロシンキナーゼ阻害剤との併用において有用な癌免疫療法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チロシンキナーゼ阻害剤との併用において有用な癌細胞障害性を機能を

担持する新規 β 1,3グルカンの特定が可能である。本発明で使用する、癌免疫療法剤は、例えば、 β 1,3グルカン構造を持つ茸菌糸体組成物製剤(例えばILX^{商品名}:東西医薬研究所、ILY^{商品名}:セイシン企業)、或は β 1,3グルカン構造を持つ各種酵母(海洋性酵母、パン酵母、NBGTM)が利用できる。特に海洋性酵母が好ましい。また、新規な癌免疫療法剤は、パーフォリン産生細胞の測定を組み合わせることで当業者には容易に特定可能である。この方法により、本発明では海洋性酵母が、チロシンキナーゼ阻害剤との併用において有用な癌免疫療法剤として最適であり、この系はCX3CR1発現細胞も活性化しているものと考えられた。

[0023] 本発明では、この癌免疫療法剤とチロシンキナーゼ阻害剤の併用が必須である。具体例では、ZD1839(イレッサ^{商品名})又はSTI571(グリベック^{商品名})を使ったが、各種チロシンキナーゼ阻害剤が有効に利用できる。それらの標的分子として、HER2/neu、HER3、HER4、c-kit、PDGFR、bcr-abl、EGFR等が例示される。最も効果的な分子はEGFR又はc-kitである。

チロシンキナーゼ阻害剤の投与量は、各分子標的化合物の推奨投与量に従うが、10〜500mg/日の経口投与がおこなわれる。

[0024] 癌免疫療法剤とチロシンキナーゼ阻害剤の併用は、特に限定はされないが、治療初期からでもよいし、どちらを先行させても良い。具体例では、NITC療法特に癌免疫療法剤を一定期間投与後に、チロシンキナーゼ阻害剤を併用し、劇的な臨床効果を確認した。

[0025] 本発明では、癌免疫療法剤として、IL-12産生誘導剤に加えて、NK活性化剤又はNKT活性化剤の併用が可能である。ニゲロオリゴ糖、フコイダン等の α 1,3グルカン構造を持つ化合物の組成物製剤がNK活性化剤又はNKT活性化剤として有用である。 α 1,3グルカン構造を持つ化合物は種々知られており、この既知構造とCD3(-)CD161(+)、CD3(-)CD161(+)パーフォリン産生能、CD3(+)-CD161(+)-、CD3(+)-CD161(+)-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NK活性化剤を特定可能である。なお、CD3(+)-CD161(+)-はNKT細胞の受容体NKR-P1に作用することを意味する。

[0026] α 1,3グルカン構造の糖類物質としては、例えば、ニゲロオリゴ糖(TSO)、フコイダ

ン、硫酸オリゴ糖等が挙げられる。

ニゲロオリゴ糖は、3-O- α -D-グルコピラノシル-D-グルコースを構成単位して含有する糖類である。代表的なものとしては、ニゲロース、ニゲロシルグルコース、ニゲロシルマルトース等が挙げられる。

[0027] また、市販されているニゲロオリゴ糖としては、ニゲロオリゴ糖液糖(販売者・武田食品工業株式会社)が挙げられるが、これが含有する主なニゲロオリゴ糖は(1) ニゲロース α -D-Glcp-(1,3)-D-Glc (2) ニゲロシルグルコース α -D-Glcp-(1,3)- α -D-Glcp-(1,4)-D-Glc (3) ニゲロシルマルトース α -D-Glcp-(1,3)- α -D-Glcp-(1,4)- α -D-Glcp-(1,4)-D-Glc(なお、Glcはグルコース、pはピラノースの略号である)である。

フコイダンは、狭義ではフコースの2-6分子に硫酸1分子が結合した硫酸化フコース含有多糖類であり、これにキシロースあるいはウロン酸を含有したフコイダン様多糖体を食品レベルで「フコイダン」と称している。フコイダンは、例えばコンブを破碎し、チップ化し、水溶液成分を抽出した後、抽出残渣を遠心分離により除去し、ヨードや塩化ナトリウム等の低分子物質を限外ろ過により除去して凍結乾燥化して製剤化される。

フコイダンとしては、褐藻類由来フコイダン、例えばガゴメコンブ由来のフコイダン、およびオキナワモズク由来フコイダン等が例示される。ガゴメコンブ等の褐藻類コンブ科由来のフコイダンには少なくとも3種類のフコイダン、F-フコイダン(α -L-フコースのポリマー)、U-フコイダン(β -D-グルクロン酸と α -D-マンノースを主鎖とし、側鎖に α -L-フコースをもつ)、G-フコイダン(β -D-ガラクトースを主鎖とし、側鎖に α -L-フコースをもつ)、が存在しており、いずれのフコイダンもフコースが硫酸化されている。

[0028] 硫酸オリゴ糖としては、例えば株式会社白子製のスサビノリ(*Poryphyra Yezaensis*)由来の抽出物があげられる。該抽出物の主成分は α 1,3結合のガラクタン硫酸のオリゴ糖と α 1,3結合および β 1,4結合よりなるガラクタン硫酸のオリゴ糖である。

[0029] 本発明のチロシンキナーゼ阻害剤と癌免疫療法剤、CTL活性化剤(IL-12産生誘導剤、INF γ 産生誘導剤)との併用、更にはNK活性化剤、NKT活性化剤、新生血管

阻害剤との併用は、その適用法を選別することで肺ガン(肺扁平上皮ガン、肺腺ガン、小細胞肺ガン)、胸腺腫、甲状腺ガン、前立腺ガン、腎ガン、膀胱ガン、結腸ガン、直腸ガン、食道ガン、盲腸ガン、尿管ガン、乳ガン、子宮頸ガン、脳ガン、舌ガン、咽頭ガン、鼻腔ガン、喉頭ガン、胃ガン、肝ガン、胆管ガン、精巣ガン、卵巣ガン、子宮体ガン、転移性骨ガン、悪性黒色腫、骨肉腫、悪性リンパ腫、形質細胞腫、脂肪肉腫等の治療に有効である。

[0030] 本発明に係るチロシンキナーゼ阻害剤と癌免疫療法剤、CTL活性化剤(IL-12産生誘導剤、INF γ 産生誘導剤)の併用、更にはNK活性化剤、NKT活性化剤、新生血管阻害剤との併用は、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処方にて用いられる。すなわち、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、NK活性化剤又はNKT活性化剤である α -1,3グルカン構造を持つ化合物は1g~40g/日程度、好ましくは5g~20g/日程度で、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、投与頻度は隔日又は1~3回/日で、好ましくは連日投与である。当該癌免疫療法剤、CTL活性化剤(IL-12産生誘導剤、INF γ 産生誘導剤)、NK活性化剤、NKT活性化剤は、好適には経口摂取される。

[0031] 抗ガン(化学療法)剤、放射線、あるいはステロイド併用療法を、本発明の併用に加えて行う場合には、2種類の免疫系のうち、TNF α →IFN γ →IL-12→キラーT細胞の系統が著しく障害される。そのためこれらは本発明では用いないことが好ましい。但し抗ガン剤を投与するとき、上記の免疫系を障害しない投与方法である低濃度化学療法すなわち5FU、UFT、ミフロール、フルツロン、CDDP(5 μ g~10 μ g)の低濃度の投与方法やタキソテールあるいはタキソール、アドリアマイシン、マイトマイシン、CPT-11などの低濃度抗ガン剤の投与方法等を適用することは有用である。また同様に放射線療法において低容量照射の適用、ステロイド療法においても低濃度投与等を選択する必要がある。

[0032] 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。

(NKT細胞の測定) (NK細胞の測定) (CD8の測定)

NKR-P1を有するNKT細胞の測定は、NKT細胞の細胞表面に特異的に存在する細胞表面抗原 (CD3およびCD161) の測定により行うことができる。具体的には、末梢血中のリンパ球について、CD3が陽性でかつCD161が陽性 [CD3(+)CD161(+)] の細胞を検定する。つまり、NKT細胞の細胞表面抗原であるCD3およびCD161を、モノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーを使用するTwo Color検査により測定する。ここでNKT細胞が活性化されているとは、リンパ球の中でNKT [CD3(+)CD161(+)] 細胞の割合が10%以上、より好ましくは16%以上であることをいう。NKT細胞活性化能とは、NKT細胞の割合を10%以上、より好ましくは16%以上に増加せしめる機能、またはある物質を投与する前のNKT細胞の割合より更に増強せしめる機能を意味する。

同様に [CD3(-)CD161(+)] とはCD3が陰性でかつCD161が陽性の細胞を検定することである。この方法はNK細胞の測定に有用である。

さらにCD8(+)とはCD8が陽性の細胞を検定することである。この方法はCTL活性の測定に有用である。

[0033] 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CD3、CD161、CD8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。このときCD3、CD161、CD8に対するモノクローナル抗体は、それぞれコールター社製又はベクトンディッキンソン社製のものを使用した。

[0034] (パーフォリン産生細胞の測定)

末梢血中のリンパ球について、細胞表面抗原であるCD3、CD161、CD8のうち2者とパーフォリンについてフローサイトメトリーを用いたThree Color検査により常法通り測定する。具体的には、採取した血液に固定液を加えて細胞を固定し、膜透過液を添加後、抗パーフォリン抗体 (Pharmingen社製) を添加して反応させ、さらにPRE-Cy5標識二次抗体 (DAKO社製) を添加して反応させ、ついで抗CD3-PE (Coulter 6604627) 抗体および抗CD161-FITC (B-D) 抗体を添加して反応させ、その後フローサイトメトリーで測定する。図・表中での略語はP又はPERと表示した。

[0035] (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°C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。

[0036] (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) または前記サイトカイン測定用試料の調製法で調製した試料を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Emax (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。

[0037] (IFN γ の測定)

IFN γ の測定は、BioSource Europe S.社のIFN γ EASIAキットを用いて、酵素免疫測定法 (EIA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 (standard) または上記調製した試料を2倍に希釈したものを50 μ lずつ分注し、HRP標識抗IFN- 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Emax (和光純薬株式会社製)にて測定した。IFN γ 量は、IU/mlとして表される。

[0038] (Th1/Th2比)

Th1/Th2比とは、細胞表面抗原CD4を有するヘルパーT細胞の中で、IFN γ を産生する細胞(Th1)とIL-4を産生する細胞(Th2)の比率を表すもので、CD4(+)IFN γ (+)/CD4(+)IL-4(+)と記す。Th1/Th2細胞比は、フローサイトメトリーによるヘルパーT(Th)細胞系統Three Color解析検査によって当業者には公知である常法を用いて、具体的には国際公開公報WO 02/04944号に記載の方法を用いて検定した。

[0039] (血管新生阻害能の測定)

(血管内皮細胞増殖因子/VEGFと、塩基性繊維芽細胞増殖因子/bFGF、及び血管新生阻害因子エンドスタチン/endostatinの測定)

市販キットの各酵素免疫固相法(ELISA:enzyme linked immuno sorbent assay) (ACCUCYTE Human VEGF, ACCUCYTE Human bFGF, ACCUCYTE Human Endostatin: CYTIMMUNE Sciences Inc.)で血清中濃度を測定した。

[0040] なお、臨床検査に用いた各マーカーは何れも市販品を用い、各推奨の方法により測定値を示した。表示される略字は各一般的な表示方法によった。

[0041] 患者の効果判定は、次のCR(完全寛解)、PR(部分寛解)、LNC(長期不変)、SNC(短期不変)、PD(病状進行)の5段階判定を行った。また、各癌種での奏効率とは、各癌種の全症例中のCR、PR、LNC、SNC、PDの割合を示す。

実施例

[0042] 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。

新免疫療法(NITC)として進行末期癌症例に対し治療を行ってきた。このNITCは β -1,3グルカンの投与で内因性TNF α 、IFN γ 、IL-12を誘導してCTL(キラーT細胞)を活性化し、かつ α -1,3グルカンの投与でNKおよびNKT細胞の活性化をはかると共にベターシャークの経口投与で血管新生阻害をはかるBRM療法である。患者には

、癌免疫療法剤、IL-12産生誘発剤、サメ軟骨(セイシン企業)、及び α 1,3構造をもつ糖類等を、各推奨処方により投与された。また、IL-12産生誘導剤として、ILX(東西医薬)、ILY(セイシン企業)、クレスチン(三共)、イミュトール(NBG)等を患者の症状により、単独又は併用して投与がなされた。

なお、本実施例でのIL-10量の測定は、Bio Source Europe製のキットを用いたELISA法にて行った。実際には96穴マイクロプレートの各穴に標準液または前記サイトカイン測定用試料の調製法で調製した試料を50 μ lずつ分注した後、室温にて2時間反応させた。各穴の反応液を除去し、3回洗浄後、パーオキシダーゼ標識抗ヒトIL-10モノクローナル抗体を50 μ lずつ分注し、室温にて2時間反応後、各穴の反応液を除去し、3回洗浄した。発色基質溶液を200 μ lずつ分注し、25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。620nmを対照として450nmにおける各穴の吸光度をEmax(和光純薬株式会社製)にて測定した。IL-10量は、pg/mlとして表した。

[0043] NITCを施行し有効性が認められた肺腺癌患者を対象にイレッサ(ゲフニチブ)250mg/日を経口投与した。対象患者は37例で奏効における種々の免疫マーカーの寄与度について多変量解析(ロジステック解析)を施行した。その結果、寄与度1.0以上もしくは-1.0以下のfactorは、NKT細胞[CD3(+) $CD161(+)$ 細胞]、なかでもNKT8(+) T 細胞[CD3(+) $CD161(+)$ $CD8(+)$ 細胞]とTh1/Th2比、IFN γ 、IL-12であり、マイナス要因としてはIL-10であった(図1)。なお、以下で図中NKT(8+)はNKT8(+)[CD3(+) $CD161(+)$ $CD8(+)$]、NKT(4+)はNKT4(+)[CD3(+) $CD161(+)$ $CD4(+)$]と同義である。また、(P+)とP(+))とも同義である。

ついで癌細胞を障害するに際し、各effector細胞では対象となる腫瘍細胞にパーフォリンあるいはグランザイムB蛋白を注入して、細胞障害性を発揮することが知られていることから、各々のeffector細胞中のパーフォリン産生細胞の寄与度を検討した(図2)。その結果、寄与度1.0あるいは-1.0を超えるものはNKT P(+)[CD3(+) $CD161(+)$ パーフォリン(+)]、なかでもNKT8(+) $P(+)$ [CD3(+) $CD161(+)$ $CD8(+)$ パーフォリン(+)]細胞であり、 $CD8(+)$ $P(+)$ T [$CD8(+)$ パーフォリン(+)]細胞であった。また、Th1/Th2比とIL-12およびIL-10も寄与度は高かった。

さらに寄与度を比率で見た場合は、ALL/NKT8(+)[CD3(+)/CD161(+)/CD8(+)]パーフォリン(+)/CD3(+)/CD161(+)/CD8(+)]、CD8(+)/P(+)/CD8(+)[CD8(+)]パーフォリン(+)/CD8(+)]、Th1/Th2比、及びIL-10で有意であった(図3)。

[0044] 以上の結果をまとめるとNITCとイレッサの併用でeffector細胞として注目される細胞はCD3(+)/CD161(+)/CD8(+)]パーフォリン産生細胞とCD8(+)]パーフォリンT細胞が最も細胞障害性が強いと考えられる。また、その時の免疫学的作用として注目されるfactorは、Th1/Th2比とIL-10と考えられた。

[0045] 次に、NITCとイレッサの併用療法において有効群23例と無効群14例において、いずれの免疫学的factorが重要かを検討し図4、図5、図6に示した。NKT8(+)[CD3(+)/CD161(+)/CD8(+)]細胞では、NKT8(+)/P(+)[CD3(+)/CD161(+)/CD8(+)]パーフォリン(+)]細胞が、無効例に比較して有効例で有意に増加していた。逆にNKT4(+)/P(+)[CD3(+)/CD161(+)/CD4(+)]パーフォリン(+)]細胞では、有効と無効とで差が認められなかった。

[0046] NK細胞で検討すると、NKP(+)/NK(CD3(-)/CD161(+)]パーフォリン(+)]/CD3(-)/CD161(+)]細胞での比においてのみ(P<0.05)有効群で増加していた(図7)。

[0047] CD8(+)]細胞では、CD8(+)/P(+)/CD8(+)[CD8(+)]パーフォリン(+)/CD8(+)]の比率がP<0.01の危険率で差が認められた(図8)。

[0048] 従って、NITCとイレッサの併用症例では、NKT8(+)/P(+)] > CD8(+)/P(+)] > NKP(+)]の順に重要であり、いずれもパーフォリン産生細胞が重要なeffector細胞であることが判明した。

[0049] 以上の分析から、NKT8(+)/P(+)[CD3(+)/CD161(+)/CD8(+)]パーフォリン(+)]細胞、CD8(+)/P(+)[CD8(+)]パーフォリン(+)]T細胞、NK P(+)[CD3(-)/CD161(+)]パーフォリン(+)]細胞が、癌細胞を障害する際のeffector細胞であることが明らかになったが、このような細胞に共通して発現している細胞が最近見出されている(非特許文献3&4)。それは、CX3CR1のケモカインを発現している細胞であって、パーフォリンやグランザイムB陽性細胞で、強い細胞障害性を発揮できる細胞であることが確認されている。このCX3CR1発現細胞では、NK細胞、単球T細胞(CD4、CD8、 γ δ T細胞)というサブセットを越えた細胞に発現し、強い細胞障害性を示すことが報告されている。今回

確認されたeffector細胞では、NITCとイレッサ併用投与で誘導される細胞であり、少なくともパーフォリン産生細胞である、NKT8(+) $P(+)$ [CD3(+) $CD161(+)$ $CD8(+)$ パーフォリン(+)]細胞が最も強力であった。ついでCD8(+) $P(+)$ [CD8(+) $CD8(+)$ パーフォリン(+)]T細胞、NK $P(+)$ [CD3(-) $CD161(+)$ パーフォリン(+)]細胞の順に細胞障害性を有していたが、この細胞は、極めてCX3CR1発現細胞と類似している。

海洋性酵母はこの細胞群を活性化することみいだしており、NITCあるいは海洋性酵母群は、CX3CR1発現細胞を活性化しているものと考えられる。

[0050] A. 肺腺癌における奏効への寄与 (N=50)

図9に示すように、NITC単独では、IFN- γ とIL-12の寄与度が高く、その時のeffector細胞が、NKT8(+) $P(+)$ /NKT8(+)[CD3(+) $CD161(+)$ $CD8(+)$ パーフォリン(+)]/CD3(+) $CD161(+)$ $CD8(+)$ 細胞、CD8(+) $P(+)$ /CD8(+)[CD8(+) $CD8(+)$ パーフォリン(+)]/CD8(+)]T細胞、NK $P(+)$ /NK[CD3(-) $CD161(+)$ パーフォリン(+)]/CD3(-) $CD161(+)$ 細胞の順に活性が高い。

B. 肺腺癌(イレッサ投与後)における奏効への寄与 (N=48)

図10に示すように、NITCとイレッサの併用では、IFN- γ とIL-12は活性化されないがTh1/Th2比バランスでコントロールされるeffector細胞があり、その細胞傷害性は、CD8(+) $P(+)$ /CD8(+)[CD8(+) $CD8(+)$ パーフォリン(+)]/CD8(+)]T細胞、NKT8(+) $P(+)$ /NKT8(+)[CD3(+) $CD161(+)$ $CD8(+)$ パーフォリン(+)]/CD3(+) $CD161(+)$ $CD8(+)$ 細胞、NK $P(+)$ /NK[CD3(-) $CD161(+)$ パーフォリン(+)]/CD3(-) $CD161(+)$ 細胞の順に活性が高い。

上記A.のNITCで誘導されるCX3CR1保有細胞は、B.のNITCとイレッサ併用時に誘導されるCX3CR1保有細胞と類似するY細胞(仮称)に比較して細胞傷害性の力価は少し劣ると考えられる。

また、Y細胞では、IFN- γ やIL-12に非依存性であるがTh1/Th2比に依存的である。

CD8(+) $P(+)$ 、NKT8(+) $P(+)$ 、NKP(+) $P(+)$ の順に細胞傷害性の力価が低下するが、図11によると、No.1-No.6までの粟粒性肺内転移を起こした末期癌でも、他臓器転移を起こした末期癌でも(強力な免疫抑制がある状態)細胞傷害性を発揮できる強力な細胞

(Y細胞)への刺激が行われていると考えられる。このY細胞は、IL-21媒介反応によって活性化される細胞と考えられる(The Journal of Immunology, 2003, 171: 608-615)

。

このIL-21 activate細胞では、TH1サイトカインやTh2サイトカインに非依存的でCD4(+)T細胞にも影響されない。また、CD8(+), NK細胞で免疫細胞に障害されにくい細胞でも強力な細胞障害を示すこと、IL-21Rを介することなどが知られているが、Y細胞と極めて類似している。

Y細胞は、IL-21で活性化し培養して本人に戻したり、拒絶反応を調整して(たとえばHLAが同じ症例)他人でも投与可能とする。

産業上の利用可能性

[0051] 以上説明したように、本発明の細胞動態の検査方法を用いることにより、チロシンキナーゼ阻害剤と癌免疫療法剤との併用において癌治療の有効性を検査することができ、より有効に癌治療を行うことが可能となる。また、本発明のスクリーニング方法を用いることにより、チロシンキナーゼ阻害剤との併用において優れた効果を有する癌免疫療法剤が得られ、当該癌免疫療法剤は癌治療に効果的に用いることができる。

請求の範囲

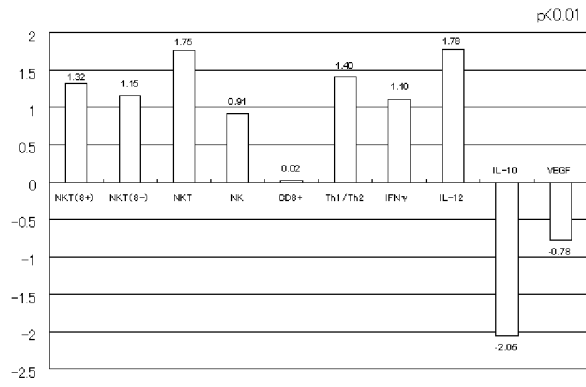
- [1] チロシンキナーゼ阻害剤と癌免疫療法剤の併用において、癌免疫療法剤によるパーフォリン産生細胞の動態をマーカーにする細胞動態の検査方法。
- [2] チロシンキナーゼ阻害剤と癌免疫療法剤の併用において、癌免疫療法剤の有効性判定のためにパーフォリン産生細胞の動態をマーカーにする癌免疫療法剤。
- [3] チロシンキナーゼ阻害剤と癌免疫療法剤の併用において、癌免疫療法剤の有効性判定のためにパーフォリン産生細胞の動態をマーカーにする癌免疫療法剤のスクリーニング方法。
- [4] チロシンキナーゼ阻害剤が、以下の少なくとも1の受容体に対する選択的標的作用を有し、癌免疫療法剤の機能がIL-12産生誘導及び／又はIL-21介在反応である請求の範囲第1項又は第3項の方法。
HER2/neu、HER3、HER4、c-kit、PDGFR、bcr-abl、EGFR
- [5] チロシンキナーゼ阻害剤が、以下の少なくとも1の受容体に対する選択的標的作用を有し、癌免疫療法剤の機能がIL-12産生誘導及び／又はIL-21介在反応である請求の範囲第2項の癌免疫療法剤。
HER2/neu、HER3、HER4、c-kit、PDGFR、bcr-abl、EGFR
- [6] 癌免疫療法剤が、 β 1,3/1,6グルカン構造を有する物質である請求の範囲第4項の方法。
- [7] 癌免疫療法剤が、 β 1,3/1,6グルカン構造を有する物質である請求の範囲第5項の癌免疫療法剤。
- [8] 癌免疫療法剤が、 β 1,3/1,6グルカン構造を有する酵母由来成分である請求の範囲第4項の方法。
- [9] 癌免疫療法剤が、 β 1,3/1,6グルカン構造を有する酵母由来成分である請求の範囲第5項の癌免疫療法剤。
- [10] パーフォリン産生細胞の動態が、NKTP(+)値、NKT8(+)P(+)値、CD8(+)P(+)T値、及びTh1/Th2比のうちの少なくとも一により判定される請求の範囲第1、3、4、6、及び8項の何れか一の方法。
- [11] パーフォリン産生細胞の動態が、NKTP(+)値、NKT8(+)P(+)値、CD8(+)P(+)T値、及び

Th1/Th2比のうちの少なくとも一により判定される請求の範囲第2、5、7、及び9項の何れか一の癌免疫療法剤。

- [12] ガンの化学療法剤及び放射線治療との併用無しに処置される請求の範囲第2、5、7、9、及び11項の何れか一の癌免疫療法剤。
- [13] NKT細胞のNKR-P1に選択的に作用してNKT細胞を活性化をおこす物質と併用される請求の範囲第2、5、7、9、11、及び12項の何れか一の癌免疫療法剤。
- [14] 血管新生阻害能を有する物質と併用される請求の範囲第2、5、7、9、11、12及び13項の何れか一の癌免疫療法剤。

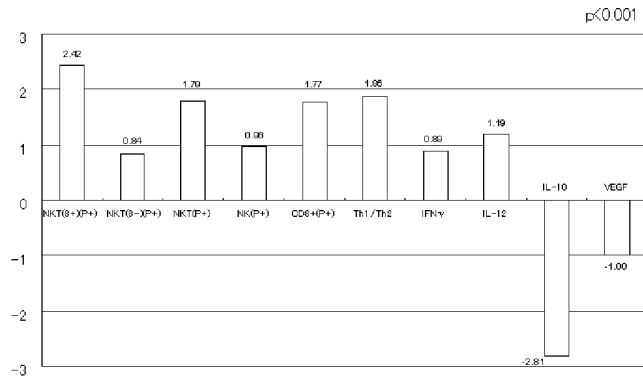
[図1]

NITO施行後イレッサ投与における肺腺癌症例の奏効への寄与(N=37)



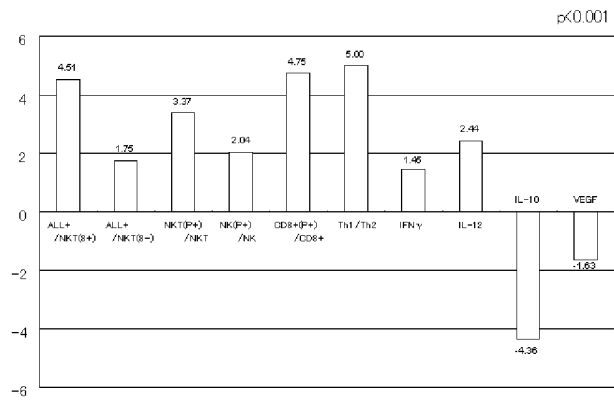
[図2]

NITO施行後イレッサ投与における肺腺癌症例の奏効への寄与(N=37)

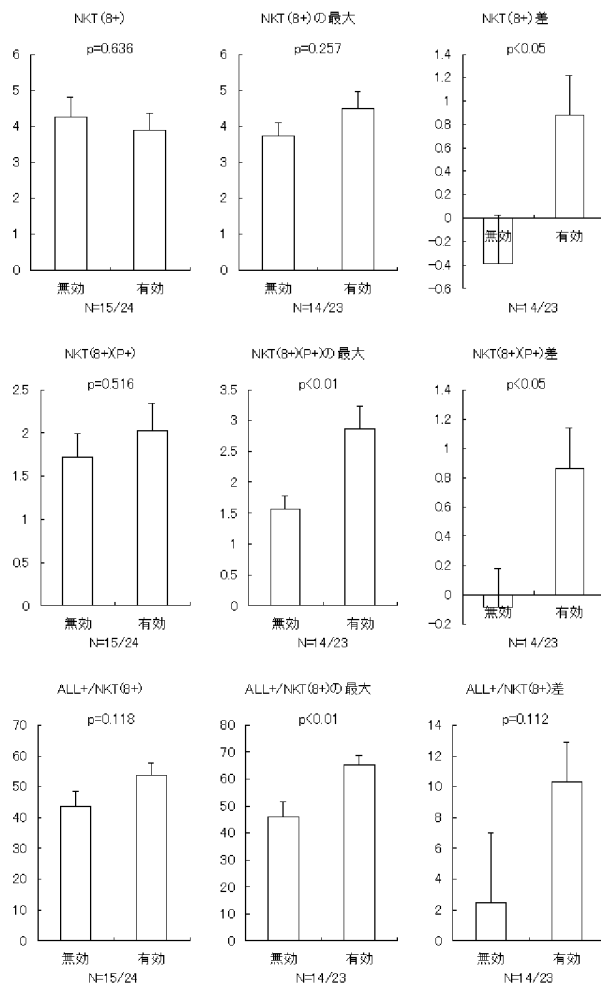


[図3]

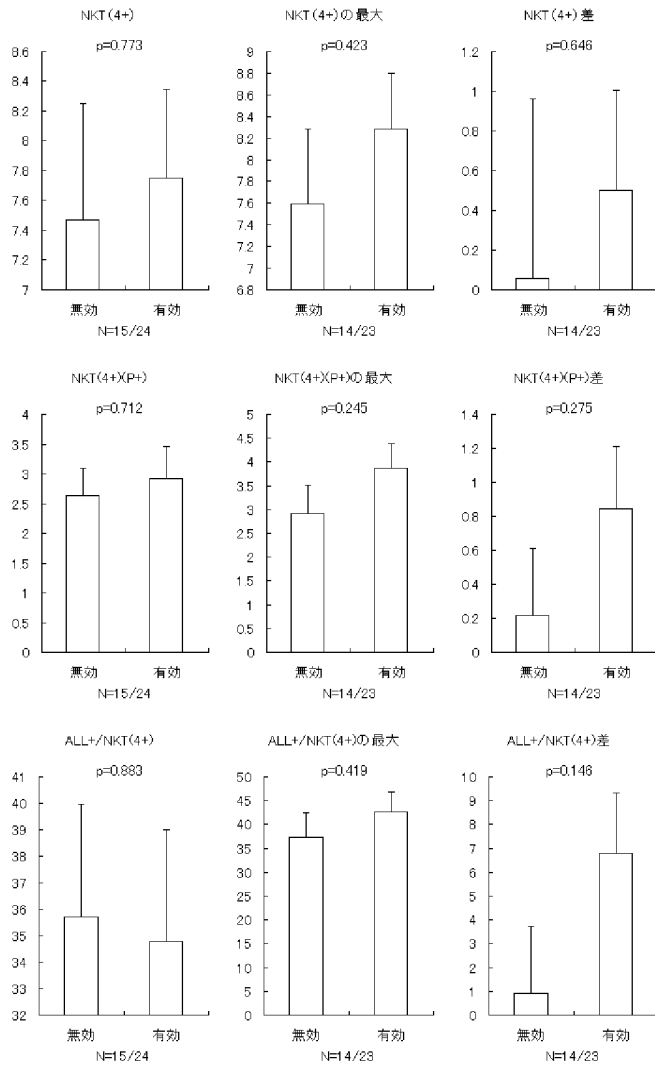
NITO施行後イレッサ投与における肺腺癌症例の奏効への寄与(N=37)



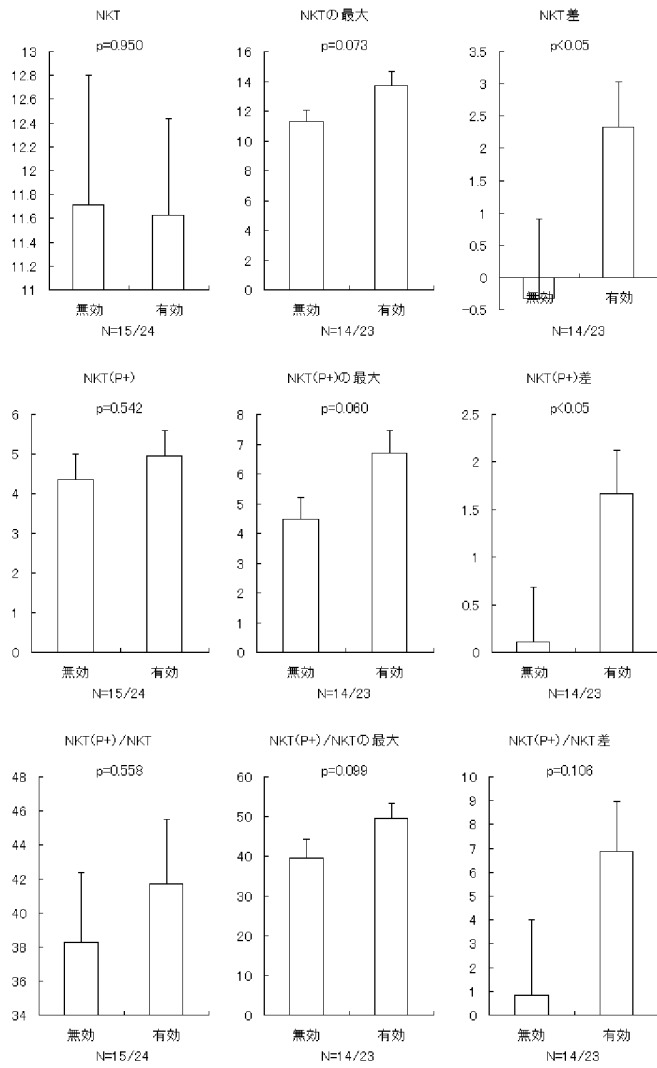
[図4]



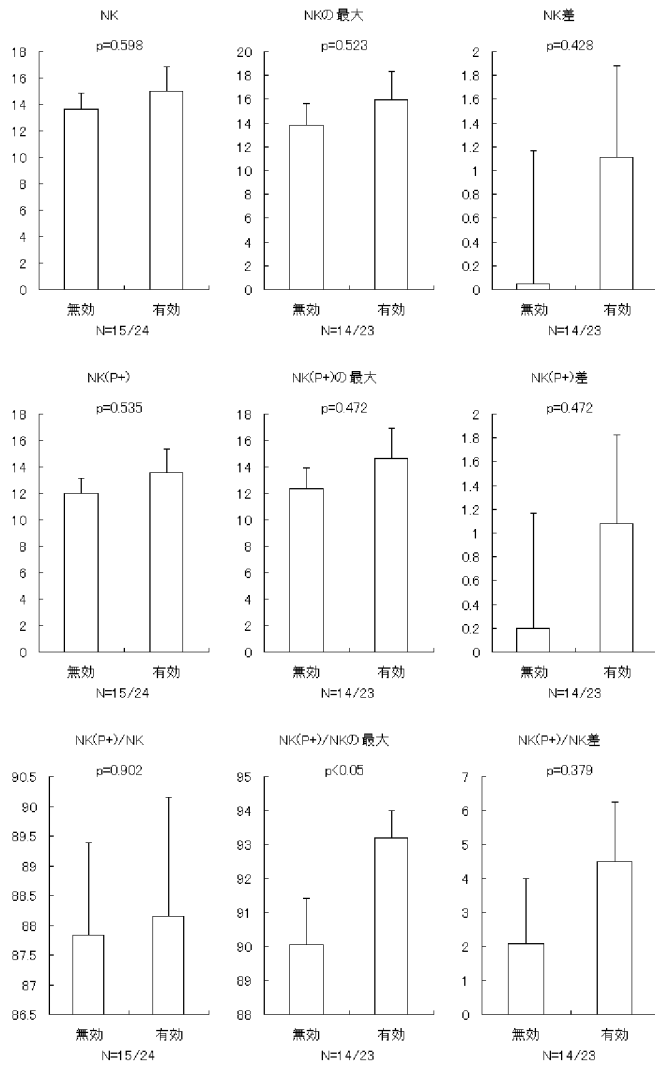
[図5]



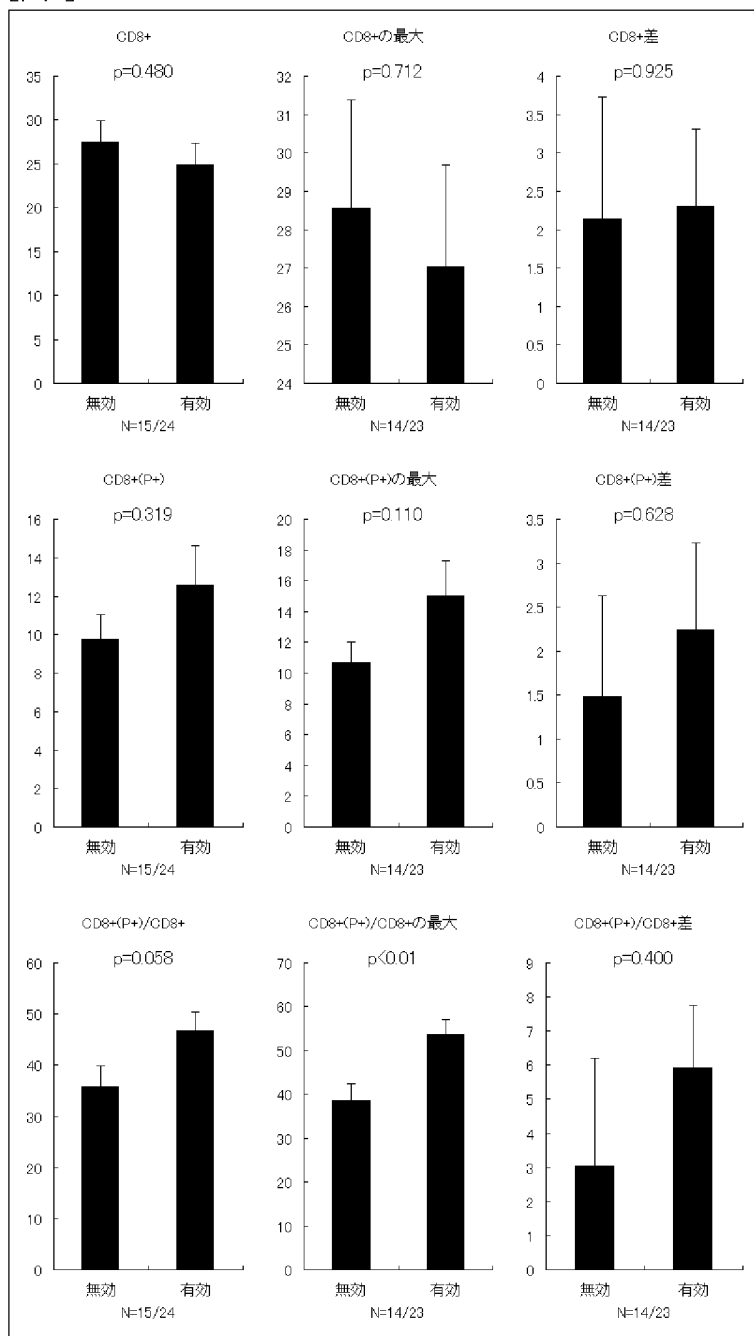
[図6]



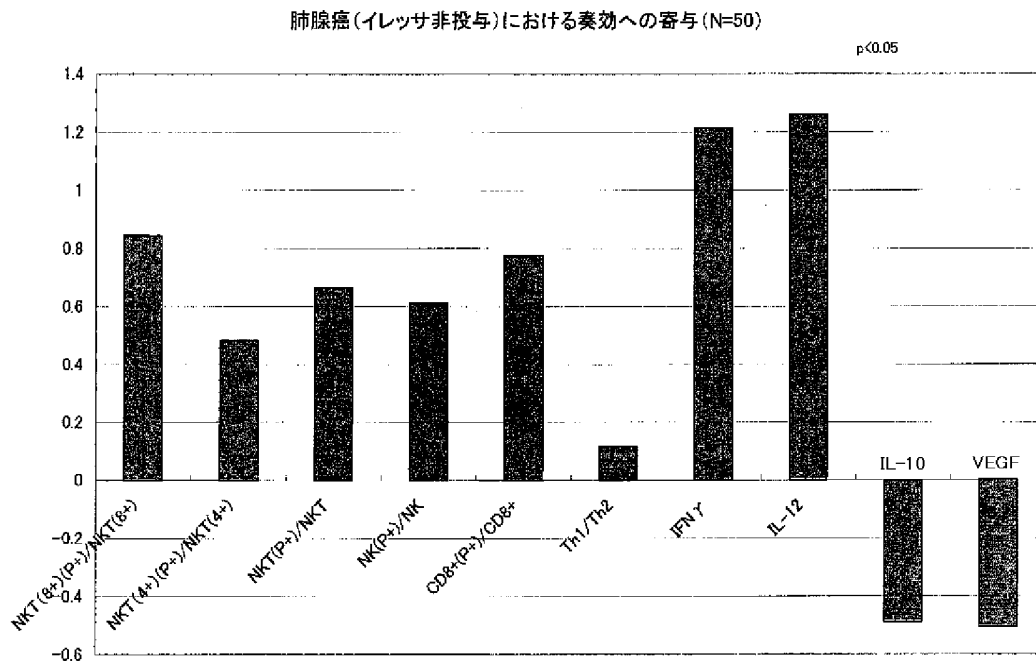
[図7]



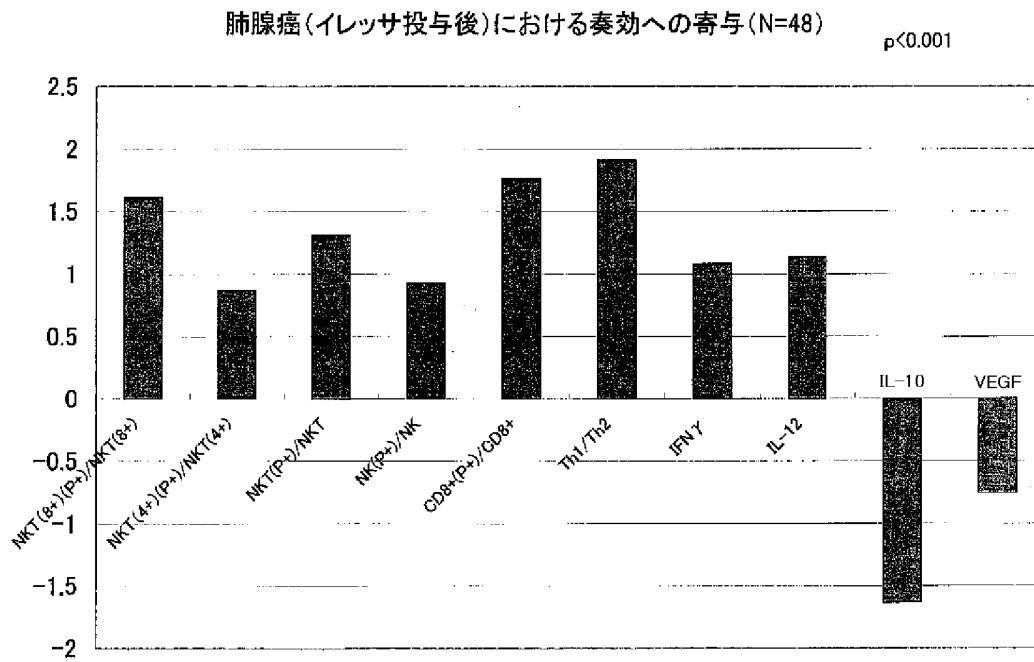
[図8]



[図9]



[図10]



[図11]

肺腺癌の奏効率(n=30) (イレッサとNITCの併用)

		年齢	性別	転移巣	評価
1	T. H.	61	F	肋骨	PR
2	N. S.	59	M	脳、頸椎、胸椎	PR
3	T. I.	59	M	両肺、骨(多発)	PR
4	T. K.	41	F	脳	PR
5	U. S.	79	F		PR
6	O. N.	54	M	胸椎、骨(多発)、脳	PR
7	H. T.	78	M		CR
8	K. F.	71	F	骨(多発)	CR
9	S. Y.	69	M		PR
10	K. M.	74	F		PR
11	O. K.	69	F		PR
12	K. K.	73	M	脳	PR
13	S. Y.	65	F		PR
14	S. T.	58	F		PR
15	T. H.	60	M		PR
16	F. T.	66	F		PR
17	T. K.	66	M		PR
18	H. K.	71	F		PR
19	Y. M.	55	F		PR
20	T. M.	64	F	骨	PR
21	M. F.	51	F		PR
22	H. K.	66	F	*	PR
23	O. K.	57	F		PR
24	I. Y.	73	M		NC
25	S. K.	55	M		NC
26	I. Y.	76	M	骨(多発)	NC
27	S. K.	67	M	副腎、骨盤	NC
28	K. T.	74	F		NC
29	S. K.	61	F		NC
30	M. K.	73	M		NC

*1~6: 粟粒状肺転移

*重複癌(肺癌+乳癌)

奏効率: CR+PR 76.6%(23/30)
 NC 23.3%(7/30)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017843

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/02, G01N33/574, A61P35/00, A61K31/715

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90, C12Q1/00-3/00, G01N33/574, A61P35/00, A61K31/715

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JSTPLUS FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/39568 A1 (Orient Cancer Therapy Co., Ltd.),	2, 5, 7, 9,
Y	15 May, 2003 (15.05.03), Page 4, line 25 to page 5, line 8; page 6, lines 7 to 18 & US 2004/266726 A1	<u>11-14</u> 1-14
Y	Masaji MARUYAMA et al., 'Tangan Mouse ni Okeru Gefitinib to Men'eki Ryoho Heiyo ni Tsuite no Igi', Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy (2003 October), Vol.30, No.11, pages 1773 to 1775	1-14
Y	HERBST RS. et al., Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer. Clin.Cancer Res. (01 December, 2003 (01.12.03)), Vol.9, pages 5813 to 5824	1-14

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
11 January, 2005 (11.01.05)Date of mailing of the international search report
01 February, 2005 (01.02.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017843

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01/82935 A1 (Orient Cancer Therapy Co., Ltd.), 08 November, 2001 (08.11.01), & EP 1277472 A1 & US 6464981 B2 & US 6818624 B2 & JP 2002-003403 A	13
P, X	WO 04/26341 A1 (Orient Cancer Therapy Co., Ltd.), 01 April, 2004 (01.04.04), (Family: none)	1-14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ C12Q1/02, G01N33/574, A61P35/00, A61K31/715

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ C12N15/00-15/90, C12Q1/00-3/00, G01N33/574, A61P35/00, A61K31/715

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用する電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JSTPLUSファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO 03/39568 A1 (株式会社オリエントキャンサーセラピー) 2003.05.15 & US 2004/266726 A1 第4頁第25行目から第5頁第8行目、第6頁第7-18行目参照	2, 5, 7, 9, 11-14 1-14
Y	丸山正二他、「担癌マウスにおけるGefitinibと免疫療法併用について の意義」、 癌と化学療法 (2003 Oct), Vol. 30, No. 11, p. 1773-1775	1-14

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 11. 01. 2005 国際調査報告の発送日 01. 2. 2005

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 佐久 敬	4B 3037
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	HERBST RS. et al., Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer. Clin.Cancer Res. (2003 Dec 1), Vol. 9, p. 5813-5824	1-14
Y	WO 01/82935 A1 (株式会社オリエントキankerセラピー) 2001. 11. 08 & EP 1277472 A1 & US 6464981 B2 & US 6818624 B2 & JP 2002-003403 A	13
P, X	WO 04/26341 A1 (株式会社オリエントキankerセラピー) 2004. 04. 01 (ファミリーなし)	1-14