

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 8 月 9 日(09.08.2012)



(10) 国際公開番号

WO 2012/105224 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 33/42 (2006.01) A61L 27/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/000584
- (22) 国際出願日: 2012 年 1 月 30 日(30.01.2012)
- (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 2011-018844 2011 年 1 月 31 日(31.01.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): オリ
ンパス株式会社(OLYMPUS CORPORATION)
[JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4
3 番 2 号 Tokyo (JP). 静岡県(SHIZUOKA PREFEC-
TURE) [JP/JP]; 〒4208601 静岡県静岡市葵区追手
町 9 番 6 号 Shizuoka (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 丸山 宏二
(MARUYAMA, Kouji) [JP/JP]; 〒4118777 静岡県駿
東郡長泉町下長窪 1 0 0 7 番地静岡県立静岡がん
センター研究所内 Shizuoka (JP). 高橋 満

(TAKAHASHI, Mitsuru) [JP/JP]; 〒4118777 静岡県駿
東郡長泉町下長窪 1 0 0 7 番地静岡県立静岡がん
センター研究所内 Shizuoka (JP). 中川 雅裕
(NAKAGAWA, Masahiro) [JP/JP]; 〒4118777 静岡県
駿東郡長泉町下長窪 1 0 0 7 番地静岡県立静岡
がんセンター研究所内 Shizuoka (JP). 秋山 靖人
(AKIYAMA, Yasuto) [JP/JP]; 〒4118777 静岡県駿東
郡長泉町下長窪 1 0 0 7 番地静岡県立静岡がん
センター研究所内 Shizuoka (JP). 石井 秀衛
(ISHII, Hidee) [JP/JP]; 〒4118777 静岡県駿東郡長泉
町下長窪 1 0 0 7 番地静岡県立静岡がんセン
ター研究所内 Shizuoka (JP). 程 錦雁(CHENG,
Jinyan) [CN/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷 2
丁目 4 3 番 2 号オリンパス株式会社内 Tokyo
(JP).

(74) 代理人: 廣田 雅紀(HIROTA, Masanori); 〒
1070052 東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号若林ビ
ル 3 階 Tokyo (JP).

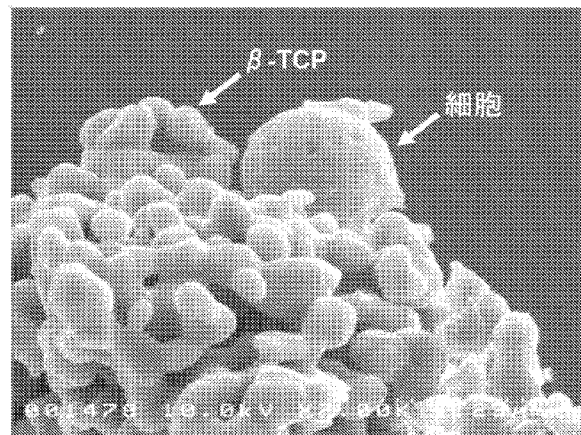
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,

[続葉有]

(54) Title: VACCINE ADJUVANT

(54) 発明の名称: ワクチン・アジュバント

[図1]



AA CELL

(57) Abstract: In recent years, vaccine therapies based on vaccine compositions are anticipated for treating diseases such as cancer by utilizing the body's inherent immune system, but cases of insufficient treatment results have been a problem. For that reason, there is a need for a safe and low-cost vaccine treatment adjuvant capable of enhancing antigenicity and of achieving a sufficient vaccine treatment effect. If lymphocytes can be made to migrate and collect in and around a tumor, the effectiveness of vaccine compositions may be further improved. The purpose of the present invention is to provide a safe and low-cost vaccine treatment adjuvant capable of enhancing the effect of vaccine compositions. Implantation of a dense body of β -tricalcium phosphate (TCP) into the body functions to allow activity, migration and accumulation of immune cells, and the inventors discovered that the therapeutic effect of vaccine compositions can be enhanced by utilizing this function, which led to the perfection of the present invention.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2012/105224 A1



MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨー

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

近年、生体が本来持つ免疫システムを利用してがんなどの疾患を治療する、ワクチン組成物によるワクチン療法が期待されているが、治療効果が十分に得られないケースが問題となっている。そのため、抗原性を増強し、十分なワクチン療法の効果を得ることができる、安全で、安価なワクチン療法の補助剤、アジュバントが求められている。腫瘍及びその近傍にこれらリンパ球を遊走・集積させることができれば、ワクチン組成物の有効性をさらに改善できる可能性がある。本発明の課題は、ワクチン組成物の効果を増強することができる安価で安全なワクチン療法の補助剤、アジュバントを提供することにある。β-リン酸三カルシウム (TCP) の緻密体を体内に移植することにより、免疫細胞を活性・遊走・集積させる機能がある。発明者らは、この機能を利用することによりワクチン組成物による治療効果を増強することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

明 細 書

発明の名称： ワクチン・アジュバント

技術分野

[0001] 本発明は、ワクチン療法の効果増強剤（ワクチン・アジュバント）やワクチン療法キット、より詳しくは、対象の体内に移植されて用いられるβーリン酸三カルシウム（TCP：Tricalcium phosphate）を有効成分とする、ワクチン組成物を用いるワクチン療法の効果増強剤や、βーリン酸三カルシウムを含む組成物とワクチン組成物とからなるワクチン療法キットに関する。

背景技術

[0002] 免疫は表面のバリアを越えて外から体内に侵入した細菌やウィルスを排除し、生体を防御するシステムである。免疫応答の誘起と制御は、Bリンパ球、Tリンパ球、抗体、及び抗原提示細胞（APC）などによって複合的に行われる。まず、APCに取り込まれ、プロセッシングを受けた外来抗原は、主要組織適合複合体（MHC）クラスⅠ及びⅡ分子に結合した状態でヘルパーT細胞に提示される。MHCに結合した外来抗原がヘルパーT細胞により認識されると、T細胞の活性化が起こり、サイトカインが分泌され、抗原で刺激されたB細胞が抗体産生細胞へと分化するのを助けると共に、キラーT細胞の分化を促す。B細胞から分泌された抗体、及び活性化されたT細胞によって、抗原を提示する細胞が排除され、外来抗原を排除する細胞性・体液性の反応が進行する。

[0003] そして、免疫は体外から進入する病原菌だけでなく、元来は自己の細胞であった、がん化した細胞や、ウィルスや細菌が感染した細胞など、異常な自己の細胞に対してもはたらいている。そして、近年、このような生体が本来持つ免疫システムを利用し、宿主の免疫系が標的抗原として認識し得る異常な細胞の成分を抗原として宿主に人為的に与えることで、異常な細胞に対する免疫を誘導し、疾患を治療または予防する、ワクチン療法が期待されている。従来のがん治療においては、手術や放射線療法が主な治療となっている

が、微小ながん組織が残存し、それががんの再発を引き起こすという問題がある。そこで、ワクチン療法による残存している可能性のある微小ながん組織の根絶、再発防止が期待されている。

[0004] ワクチン療法に使用されるワクチン抗原として、例えば、腫瘍の予防または治療で使用するためのワクチン T L P ペプチド（特許文献 1）や、血清を使用した c D N A ディスプレイライブラリーの選択による特異的腫瘍抗原の同定方法及び、同定された腫瘍抗原（特許文献 2）や、メゾテリンの M H C クラス I 結合エピトープを含むポリペプチドを含むワクチン（特許文献 3）が開示されている。現在まで、様々な腫瘍抗原を用いたがんワクチン療法に対する研究が試みられているが、がん患者に対する治療効果は、期待されるほど十分には認められていないのが現状である。アジュバントは、抗原性補強剤とも呼ばれ、抗原性を増強するために用いられる試薬である。そこで、抗原性を増強し、十分なワクチン療法の効果を得るためのワクチン療法の補助剤、アジュバントが求められていた。

[0005] 他方、 β -リン酸三カルシウムを含むリン酸カルシウム系化合物は、その優れた生体親和性により人工骨、人工歯根などの生体材料として応用研究が盛んに行われている（特許文献 4、5）。本発明者らは、多孔体の β -リン酸三カルシウムがマクロファージの活動を活発化させることにより悪性腫瘍を抑制することを明らかにし、気孔率 75% の β -リン酸三カルシウムの粉末をシートにコーティングした癌細胞抑制シートからなる癌細胞抑制剤（特許文献 6、非特許文献 1）を開発している。しかしながら、 β -リン酸三カルシウムとワクチン組成物を併用する効果については全く知られていなかった。

[0006] その他、これまでに人工的にリンパ節を構築する試みは幾つかあったが、自然のリンパ節と非常に類似した構造を持ち、しかも実際に生体内で強力な免疫機能を発揮する免疫装置の開発の成功は全くなかった。例えば、特許文献 7 には、コラーゲンスポンジを用いた支持体に支持細胞（ストローマ細胞）を播き、かかる支持体を腎臓の被膜の下に埋め込むことで、人工リンパ節

となり、抗体産生、癌細胞の排除などの免疫反応を強力に起こすことが開示されている。しかしこれらはいずれも細胞を使用しており、試験管の細胞培養や、人工材料を用いた構築などの工程が必要であった。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：特表2003-523759号公報
特許文献2：特表2005-508309号公報
特許文献3：特表2006-521090号公報
特許文献4：特開2010-233914号公報
特許文献5：特開平7-116175号公報
特許文献6：特開2010-126434号公報
特許文献7：特開2008-163015号公報

非特許文献

- [0008] 非特許文献1：J. Cheng et al., J. Biomed. Mater. Res. A, 92(2):542-547 (2010)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] 近年、生体が本来持つ免疫システムを利用し、宿主の免疫系が標的抗原として認識し得る異常な細胞の成分を抗原として宿主に人為的に与えることで、異常な細胞に対する免疫を誘導し、疾患を治療または予防する、ワクチン療法が期待されている。しかしながら、例えばがん患者に対する治療効果は、期待されるほど十分には認められていないのが現状である。この問題を解決するために、抗原性を増強し、十分なワクチン療法の効果を得るための安価で安全なワクチン療法の補助剤が求められている。本発明の課題は、ワクチン組成物の効果を増強することができる安価で安全なアジュバントを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0010] 発明者らは、病変部位近傍に移植された β -リン酸三カルシウム緻密体（ここでは気孔率50%以下のものを指す）により活性・誘導・集積されたT細胞、B細胞、NK細胞などのリンパ球や樹状細胞が高度に組織化された三次元構造をとることを見出した。これを利用することにより、リンパ球が抗原及び抗原提示細胞と相互作用して抗原特異的な免疫反応（適応免疫）を開始し、ワクチン組成物によるがん治療効果を増強できる。

[0011] すなわち、本発明は〔1〕対象の体内に移植されて用いられる β -リン酸三カルシウムを有効成分とする組成物と、ワクチン組成物とを備えたワクチン療法キットや、〔2〕体内が、皮内、皮下、又は筋肉内であることを特徴とする〔1〕記載のワクチン療法キットや、〔3〕 β -リン酸三カルシウムが病変近傍に移植されることを特徴とする〔1〕又は〔2〕記載のワクチン療法キットや、〔4〕病変近傍が、病変から0.1～15cmの距離にある領域であることを特徴とする〔3〕記載のワクチン療法キットや、〔5〕ワクチン組成物が、がん特異的抗原ワクチンであることを特徴とする〔1〕～〔4〕のいずれか記載のワクチン療法キットや、〔6〕がん特異的抗原ワクチンが、TRP-2 (Tyrosinase-related protein 2)、WT1 (Wilms tumor 1)、オバルブミン (OVA)、又はがん細胞抽出液 (Tumor lysate) 由来の抗原ペプチド又はタンパク質であることを特徴とする〔1〕～〔6〕のいずれか記載のワクチン療法キットに関する。

[0012] また、本発明は〔7〕 β -リン酸三カルシウムが、気孔率50%以下の緻密体であることを特徴とする〔1〕～〔6〕のいずれか記載のワクチン療法キットや、〔8〕 β -リン酸三カルシウムが、T細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞、及びマクロファージを活性化、誘導、又は集積することを特徴とする〔7〕記載のワクチン療法キットや、〔9〕 β -リン酸三カルシウムが、錠剤又は柱状体であることを特徴とする〔1〕～〔8〕のいずれか記載のワクチン療法キットや、〔10〕 β -リン酸三カルシウムが、粒径0.05～25 μ mの粒子または顆粒であることを特徴とする〔1〕～〔8〕のいずれか記載のワクチン療法キットに関する。

[0013] また、本発明は [11] 対象の体内に移植されて用いられる β -リン酸三カルシウムを有効成分とする、ワクチン組成物を用いるワクチン療法の効果増強剤や、[12] 体内が、皮内、皮下、又は筋肉内であることを特徴とする [11] 記載のワクチン療法の効果増強剤や、[13] β -リン酸三カルシウムが病変近傍に移植されることを特徴とする [11] 又は [12] 記載のワクチン療法の効果増強剤や、[14] 病変近傍が、病変から 0.1～1.5 cm の距離にある領域であることを特徴とする [13] 記載のワクチン療法の効果増強剤や、[15] ワクチン組成物が、がん特異的抗原ワクチンであることを特徴とする [11]～[14] のいずれか記載のワクチン療法の効果増強剤や、[16] がん特異的抗原ワクチンが、TRP-2 (Tyrosinase-related protein 2)、WT1 (Wilms tumor 1)、オバルブミン (OVA)、又はがん細胞抽出液 (Tumor lysate) 由来の抗原ペプチド又はタンパク質であることを特徴とする [15] 記載のワクチン療法の効果増強剤に関する。

[0014] また、本発明は [17] β -リン酸三カルシウムが、気孔率 50% の緻密体であることを特徴とする [11]～[16] のいずれか記載のワクチン療法の効果増強剤や、[18] β -リン酸三カルシウムが、T細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞、及びマクロファージを活性化、誘導、又は集積することを特徴とする [17] 記載のワクチン療法の効果増強剤や、[19] β -リン酸三カルシウムが、錠剤又は柱状体であることを特徴とする [11]～[18] のいずれか記載のワクチン療法の効果増強剤や、[20] β -リン酸三カルシウムが、粒径 0.05～25 μ m の粒子又は顆粒であることを特徴とする [11]～[18] のいずれか記載のワクチン療法の効果増強剤に関する。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、対象の体内に移植されて用いられる β -リン酸三カルシウム (TCP) を有効成分とする組成物、及びワクチン組成物とからなるワクチン療法キットや、対象の体内に移植されて用いられる β -リン酸三カル

シウムを有効成分とするワクチン療法の効果増強剤を提供することができ、ワクチン療法の効果を増強し、疾患を治療することができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]免疫細胞と β -TCP顆粒（サイズ $25 \sim 75 \mu\text{m}$ ）の結合を走査型電子顕微鏡にて観察した結果を示す。

[図2] β -TCP緻密体（緻密体錠剤： $\phi 5 \times 2 \text{ mm}$ ）を、走査型電子顕微鏡にて観察した結果を示す。直径 $2 \mu\text{m}$ の粒子は、マーカーとして用いられている。

[図3] β -TCP緻密体（緻密体棒剤： $\phi 0.9 \times 5 \text{ mm}$ ）を、走査型電子顕微鏡にて観察した結果を示す。

[図4] β -TCP緻密体（錠剤）を正常マウスの皮下に移植して2週間経過後、組織サンプルをHE染色し、顕微鏡にて観察した。リンパ球が集積し、天然のリンパ節と似た構造となっていることを示す図である。

[図5] β -TCP緻密体（顆粒）サイズ $0.05 \sim 105 \mu\text{m}$ を正常マウスの皮下に移植して2週間経過後、組織サンプルをHE染色し、顕微鏡にて観察した。サイズ $75 \mu\text{m}$ 以上の β -TCP顆粒はマクロファージを誘導し（ $N = 13$ ）、 $75 \mu\text{m}$ 以下の顆粒はリンパ球を集め（ $N = 11$ ）、サイズ $0.05 \sim 25 \mu\text{m}$ の微小顆粒はリンパ球集塊を形成すること（図中矢印）を示す図である

[図6]円板状の β -TCP緻密体錠剤 $\phi 5 \times 2 \text{ mm}$ を皮下に移植した正常マウスの組織サンプルを、抗CD45R抗体を用いてB細胞を免疫組織染色し、顕微鏡にて観察した。 β -TCP緻密体によりB細胞が誘導されることを示す図である（左：弱拡大 $\times 4$ 、右：強拡大 $\times 40$ 矢印部）。

[図7]円板状の β -TCP緻密体錠剤 $\phi 5 \times 2 \text{ mm}$ を皮下に移植した正常マウスの組織サンプルを、抗CD3抗体を用いてT細胞を免疫組織染色し、顕微鏡にて観察した。 β -TCP緻密体によりT細胞が誘導されることを示す図である（左：弱拡大 $\times 4$ 、右：強拡大 $\times 40$ 矢印部）。

[図8]円板状の β -TCP緻密体錠剤 $\phi 5 \times 2 \text{ mm}$ を皮下に移植した正常マウ

スの組織サンプルを、抗CD49b抗体を用いてNK細胞を免疫組織染色し、顕微鏡にて観察した。 β -TCP緻密体によりNK細胞が誘導されることを示す図である（左：弱拡大 $\times 4$ 、右：強拡大 $\times 40$ 矢印部）。

[図9]円板状の β -TCP緻密体錠剤 $\phi 5 \times 2$ mmを皮下に移植した正常マウスの組織サンプルを、抗CD11c抗体を用いて樹状細胞を免疫組織染色し、顕微鏡にて観察した。 β -TCP緻密体により樹状細胞が誘導されることを示す図である（左：弱拡大 $\times 4$ 、右：強拡大 $\times 40$ 矢印部）。

[図10]円板状の β -TCP緻密体錠剤 $\phi 5 \times 2$ mmを皮下に移植した正常マウスの組織サンプルを、抗F4/80R抗体を用いてマクロファージを免疫組織染色し、顕微鏡にて観察した。 β -TCP緻密体によりマクロファージが誘導されることを示す図である（左：弱拡大 $\times 4$ 、右：強拡大 $\times 40$ 矢印部）。

[図11]円板状の β -TCP緻密体錠剤 $\phi 5 \times 2$ mmを皮下に移植した正常マウスの組織サンプルを、抗D2-40抗体を用いてリンパ管内皮細胞を免疫組織染色し、顕微鏡にて観察した。 β -TCP緻密体によりリンパ管形成が誘導されることを示す図である（左：弱拡大 $\times 4$ 、右：強拡大 $\times 40$ 矢印部）。

[図12]ワクチンの実験系として、C57BL/6系統のマウスとトリ・オバルブミンを発現するマウスのリンパ腫細胞であるE.G7-OVA（ATCC社より購入）を用いる腫瘍モデル実験系において、以下の3群、すなわち、1）コントロール群、2）OVA投与群、3）OVA+TCP群を設定し、6週齢の雄性マウス（C57BL/6）側腹部皮下に $\phi 5$ mm $\times$ 厚さ2 mmの円板状の β -TCPの錠剤を移植した（OVA+TCP群）。7日後および14日後に、移植した β -TCP錠剤周囲の皮内（OVA+TCP群）または側腹部皮内（OVA投与群）に100 μ gのOVA蛋白を投与し、21日後、側腹部皮下に 1×10^5 個のE.G7-OVA細胞を移植し、腫瘍の形成及び増殖について観察した。図中の*は、 β -TCP移植後にOVAタンパク質で免疫したOVA+TCP群では、実験開始42日後及び45日後においてコントロール群に比べて有

意に腫瘍増殖が抑制されたことを示す（t test、 $p < 0.05$ ）。

発明を実施するための形態

- [0017] 本発明のワクチン療法キットとしては、体内に移植されて用いられる、換言すれば体内に移植するための β -リン酸三カルシウム（以下、「 β -TCP」という）を有効成分とする組成物と、ワクチン組成物とを備えたものであれば特に制限されず、また本発明のワクチン組成物を用いるワクチン療法の効果増強剤としては、 β -TCPを有効成分とする組成物であれば特に制限されず、本発明の一形態として、対象の体内に β -リン酸三カルシウムを有効成分とする組成物を移植した後に、ワクチン組成物を投与するワクチン療法や、ワクチン組成物を用いるワクチン療法の効果増強剤製造のための、対象の体内に移植されて用いられる β -リン酸三カルシウムの使用を挙げることができる。上記 β -TCPは $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ で表される組成物の一結晶形態であって、常温において安定であり生体親和性のある化合物である。 β -TCPとしては、市販の β -TCP粉末や β -TCPブロック、例えば人工骨として利用される β -TCPブロックなどを用いてもよいし、公知の方法（特開2004-26648など）により製造してもよく、また α -TCP粉末から製造する（特開2006-89311など）こともできる。また、本発明の β -TCP組成物は、実質的に β -TCP組成からなるものや、界面活性剤や水などを混入して製造されたものでもよいが、 β -TCPブロックを粒子又は顆粒状に加工した β -TCPの粉末の他、 β -TCP粉末を打錠により緻密化、あるいは焼結により脱泡の上緻密化した、高強度、高密度、低気孔率である、多結晶体の β -TCP緻密体、中でも気孔率50%以下の β -TCP緻密体であることが好ましい。本発明において、 β -TCP緻密体とは気孔率50%以下の β -TCPをいう。また本発明において、粉末、粒子、顆粒はいずれも粒状の形態を指し、実質的な区別はない。
- [0018] かかる β -TCP緻密体を構成する多結晶体の粒子サイズとして、好ましくは0.001~50 μm 、より好ましくは0.01~20 μm 、さらに好ましくは0.75~10.0 μm であり、平均の多結晶体の粒子サイズは好

ましくは $1.80\mu\text{m}$ である。さらに、多結晶体の粒子の隙間は好ましくは $0.001\sim 10\mu\text{m}$ 、より好ましくは $0.005\sim 5\mu\text{m}$ 、 $0.01\sim 1.0\mu\text{m}$ であり、平均の多結晶体の粒子の隙間は好ましくは $0.05\sim 0.2\mu\text{m}$ 、より好ましくは $0.1\mu\text{m}$ である。かかる多結晶体の粒子の隙間の大きさや数により、 β -TCP緻密体の気孔が定められる。

[0019] β -TCPの気孔率は、細孔に水銀を浸入させるために圧力を加え、圧力と圧入された水銀量から比表面積や細孔分布を求める水銀法や、検量線を用いて密度から測定することもできる。また、気孔率が0%の β -TCP石（測定対象の焼結体と同じ組成、結晶形の気孔をもたない β -TCP焼結体）の真密度 ρ を測定しておき、測定対象の焼結体の体積と重さから算出した見かけ密度 ρ' とから気孔率 $P(\%) = (1 - \rho' / \rho) \times 100$ として算出することができる。また、気孔率 P は、例えば、アキュピック1330シリーズ（株式会社島津製作所製）を用いて測定することもできる。 β -TCPブロックの水銀法にて計測した気孔率は、好ましくは50～90%、より好ましくは60～85%、さらに好ましくは70～80%である。粒径 $75\sim 105\mu\text{m}$ の β -TCP粉末は β -TCPブロックを粉砕して作製することもでき、これを水銀法にて計測したそれぞれの粉末の気孔率は、好ましくは50～90%、より好ましくは55～85%、さらに好ましくは57～80%であり、好ましい平均気孔率は60～70%である。また、粒径 $25\mu\text{m}$ 以下の β -TCPミクロン顆粒は β -TCPブロックを粒子状に粉砕して作製することもでき、これを水銀法にて計測した気孔率は好ましくは50%以下、より好ましくは40%以下、さらに好ましくは30%以下であり、好ましい平均気孔率は3.5～4.5%である。 β -TCP緻密体としては、気孔率が50%以下である β -TCP粉末、粒子、顆粒、錠剤、柱状体等を例示することができ、これらは β -TCPのみからなるものであっても、 β -TCPを有効成分とし、他の成分を含むものであってもよい。50%以下の β -TCPの気孔率は、40%以下が好ましく、30%以下がより好ましく、中でも20%以下が特に好ましい。 β -TCP粉末を打錠により緻密化し

た β -TCP緻密体の、密度から算定した気孔率としては、好ましくは50%以下、より好ましくは40%以下、さらに好ましくは30%以下、中でも20%以下を好適に例示することができる。また、焼結により脱泡の上緻密化した β -TCP緻密体は、密度から算定した気孔率が、好ましくは50%以下、より好ましくは40%以下、さらに好ましくは30%以下、中でも20%以下を好適に例示することができる。

[0020] 焼結による緻密化は、好ましくは600℃超～2000℃、より好ましくは750～1500℃、さらに好ましくは900～1300℃で、また好ましくは1～100時間、より好ましくは10～80時間、さらに好ましくは20～50時間焼結する例を挙げることができる。また、焼結は複数の温度にて複数回に分けて行ってもよい。例えば、棒状の β -TCP緻密体は以下の方法で製造することもできる。リン酸水素カルシウム、炭酸カルシウム及び水を適切な割合で混合してスラリーを調製し、調製したスラリーを摩砕しながら反応させた後に乾燥させる。次に、乾燥して得られた固形物を粉碎して仮焼し、 β -TCP粉末が得られる。得られた β -TCP粉末を圧縮形成されることにより柱状体に賦形される。圧縮形成された柱状体を600℃～1300℃で20時間焼結する。

[0021] 上記気孔率50%以下の緻密体である β -TCP粉末や粒子、顆粒の製造方法としては、例えば、リン酸水素カルシウムと炭酸カルシウムの粉末をモル比で1:1～3、好ましくは1:1.5～2.5になるように秤量して混合し、かかるリン酸水素カルシウム-炭酸カルシウム混合物に純水を添加してスラリーを調製し、調製されたスラリーをボールミルにより約24時間湿式磨砕処理を行うことでメカノケミカル法による反応をすすめ、磨砕処理されたスラリーを、70～90℃、好ましくは75～85℃にて乾燥し、乾燥して得られた固形物を粉碎して得られた β -TCP粉末を700～800℃にて、数時間仮焼することで、 β -TCP仮焼粉末を作製し、得られた β -TCP仮焼粉末をふるいにかけることで各粒径の分画を得ることができ、分画ごとの気孔率を測定することで、気孔率50%以下の分画を得ることがで

きる。具体的には、まずふるい目が $105\mu\text{m}$ のふるいを通し、かつ、ふるい目が $75\mu\text{m}$ のふるいにかけて残った $\beta\text{-TCP}$ を分画(A)とし、次にふるい目が $75\mu\text{m}$ のふるいを通し、かつ、ふるい目が $25\mu\text{m}$ のふるいにかけて残った $\beta\text{-TCP}$ を分画(B)とし、さらに $25\mu\text{m}$ のふるいを通した $\beta\text{-TCP}$ を分画(C)とした場合に、分画(C)は、気孔率が確実に50%以下の $\beta\text{-TCP}$ となる。

[0022] 上記 $\beta\text{-TCP}$ 錠剤や $\beta\text{-TCP}$ 柱状体の製造方法としては、気孔率が50%以下の、単一相又はほぼ単一相の $\beta\text{-TCP}$ の錠剤や柱状体を製造することができる方法を挙げることができる。具体的には、前述のように $\beta\text{-TCP}$ 仮焼粉末を作製し、得られた $\beta\text{-TCP}$ 仮焼粉末を圧縮成形(打錠)することにより錠剤や柱状体に賦形し、かかる賦形された $\beta\text{-TCP}$ 仮焼錠剤や柱状体を $450\sim 650^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは 600°C にて2.5~3.5時間、好ましくは3時間焼結し、次いで $850\sim 950^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは 900°C で0.5~1.5時間、好ましくは1時間焼結し、さらに $1000\sim 1300^{\circ}\text{C}$ で0.75~1.5時間、好ましくは1時間焼結することで焼結体としての $\beta\text{-TCP}$ の錠剤や柱状体を得る方法を挙げることができ、また上記 $\beta\text{-TCP}$ 仮焼粉末を焼結し、 $\beta\text{-TCP}$ の焼結体としての粉体を得た後に圧縮成形(打錠)して $\beta\text{-TCP}$ の錠剤や柱状体を作製してもよい。なお、 $\beta\text{-TCP}$ 柱状体は、 $\beta\text{-TCP}$ 錠剤を柱状に打ち抜くことにより作製してもよい。

[0023] 本発明の $\beta\text{-TCP}$ 組成物には、 $\beta\text{-TCP}$ の他に薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を含んでいてもよく、ゲル状やペースト状、微粒子の懸濁液や、固形状の製剤とすることができるが、好ましくは固形状であり、その形状としては、顆粒状、粉末状、粒子状の他、円板状(短円柱状)、棒状(長円柱状)の錠剤などを挙げることができる。

[0024] また、固形状の $\beta\text{-TCP}$ 組成物の粒径としては、例えば、 $\beta\text{-TCP}$ ブ

ロックを粒子状に加工した β -TCP粉末の場合は、粒径が好ましくは $50 \sim 120 \mu\text{m}$ 、より好ましくは $60 \sim 110 \mu\text{m}$ 、さらに好ましくは $75 \sim 105 \mu\text{m}$ である。また、 β -TCPブロックを粒子状に加工した β -TCPミクロン顆粒の場合は、粒径が好ましくは $50 \mu\text{m}$ 以下、より好ましくは $40 \mu\text{m}$ 以下、さらに好ましくは $30 \mu\text{m}$ 以下、である。中でも、粒径が $0.05 \sim 5 \mu\text{m}$ の β -TCPミクロン顆粒や、粒径が $0.05 \sim 25 \mu\text{m}$ の β -TCPミクロン顆粒を好適に例示することができる。本発明において粒径 $0.05 \sim 25 \mu\text{m}$ の粒子は、 $25 \mu\text{m}$ のふるいを通したものを指す。円板状又は柱状や棒状の錠剤の β -TCP組成物の大きさとしては、直径が好ましくは $0.01 \sim 30 \text{mm}$ 、より好ましくは $0.1 \sim 20 \text{mm}$ 、さらに好ましくは $1 \sim 10 \text{mm}$ であり、長さが好ましくは $0.1 \sim 40 \text{mm}$ 、より好ましくは $0.5 \sim 30 \text{mm}$ 、さらに好ましくは $1 \sim 20 \text{mm}$ であるが、中でも直径 5mm で長さ 2mm の円板状の錠剤や、直径 0.9mm で長さ 10mm の柱状の棒剤を好適に例示することができる。

[0025] 本発明における体内としては、骨や歯以外の部位であれば特に制限されず、皮下、皮内、筋肉内、腹腔内、胸腔内、脳内を挙げることができ、好ましくは皮下であり、治療対象である病変の近傍を挙げることできる。病変の近傍に移植して用いられる場合は、好ましくは病変から $1 \mu\text{m} \sim 30 \text{cm}$ 、より好ましくは $100 \mu\text{m} \sim 20 \text{cm}$ 、さらに好ましくは $1 \text{mm} \sim 15 \text{cm}$ の距離にある領域に移植して用いることができる。本発明の治療対象の病変は、骨や歯以外における病変であれば特に制限はされず、がん、アレルギー免疫、感染症その他を例示することができ、中でもがんを好適に挙げることができ、頭蓋骨内組織、肺、扁平上皮細胞、皮膚、軟組織、膀胱、胃、すい臓、頭部、頸部、腎臓、前立腺、大腸、小腸、食道、女性器（例えば卵巣、子宮）又は甲状腺のがんを特に好適に例示することができる。

[0026] 本発明の β -TCPの投与方法としては、外科的処置により体内へ直接移植する方法であれば特に制限されず、他の目的の手術の際に、切開箇所の本発明の β -TCPを移植することもできる。また生体への負担を軽減する観

点から、通常の注射器や固形物の挿入用注射器によって、最小限の開口部から本発明の β -TCP組成物を体内に移植する方法を好適に例示することができる。この場合、本発明の β -TCP組成物としては、 β -TCP顆粒を含む懸濁液や、ゲル状やペースト状に調製された β -TCPや固形 β -TCPを充填した注射器、例えば棒状（長円柱状）の β -TCP緻密体が充填されたデバイス（導入装置）や、棒状（長円柱状） β -TCP緻密体とそのデバイス（導入装置）のセットを挙げることができる。また、投与量は、疾病の種類、病変の大きさ、患者の体重等により適宜選定することができ、好ましくは0.01mg~100g、より好ましくは0.1mg~10g、さらに好ましくは1mg~1gを例示することができる。

[0027] 本発明におけるワクチン組成物としては、ワクチンを含む組成物であれば特に制限されず、好ましくはがん細胞に特異的に発現している抗原ペプチド、あるいは正常細胞では低い発現を示すが、がん細胞で高い発現を示す抗原ペプチドを含む組成物であり、がん細胞抽出液を用いることも、人工的に合成したり、遺伝子工学的手法を用いて作製した抗原ペプチドを使用することも、あるいは市販品を入手して利用することもできる。例えば、子宮頸がん予防用でパピローマウイルスに対するワクチンのサーバリックス（グラクソ・スミスクライン社）及びガーダシル（メルク社、治験実施中）、非小細胞肺癌治療用でMUC-1（mucin 1）に対するワクチンのStimuvax（メルクセローノ社、治験実施中）など、既に市場に出ているあるいは開発途中のワクチンをはじめ、悪性黒色腫（メラノーマ）で発現するMAGE（melanoma-associated antigen）、gp100（glycoprotein 100）、TRP-2（tyrosinase-related protein 2）、様々ながんで発現するNY-ESO-1（cancer/testis antigen 1B）やCEA（carcinoembryonic antigen）などの腫瘍関連抗原、また、最近同定されたURLC10（up-regulated lung cancer 10）、TTK（TTK protein kinase）、KOC1（IGF II mRNA結合タンパク質3）、RNF43（ring fingerタンパク質43）、TOMM34（translocase of outer mitochondrial membrane 34）、CDCA1（cell di-

vision cycle associated 1)、K I F 2 0 A (kinesin family member 20A)、D E P D C 1 (D E P domain-containing protein 1)、M P H O S P H 1 (M phase phosphoprotein 1) など腫瘍特異的に発現する遺伝子群、H E R 2 / n e u (上皮成長因子受容体 2) や W T 1 (Wilms tumor 1) などのがん遺伝子や p 5 3 とその変異体などのがん抑制遺伝子の産物である蛋白、または腫瘍への血管新生に関与する V E G F R 1 (血管内皮細胞増殖因子受容体-1) 及び V E G F R 2 (血管内皮細胞増殖因子受容体-2) などの増殖因子受容体蛋白等、腫瘍または腫瘍周辺組織 (V E G F R 1 と V E G F R 2) で特異的あるいは優先的に発現される蛋白由来の抗原ペプチドを含む医薬組成物を例示することができる。かかる抗原ペプチドの長さも 1 アミノ酸からタンパク質全長まで、適宜調製することができ、好ましくは 1 ~ 1 0 0 0 アミノ酸、より好ましくは 2 ~ 3 0 0 アミノ酸、さらに好ましくは 3 ~ 1 0 0 0 アミノ酸を挙げることができる。かかるワクチン組成物は薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、p H 緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を含んでいてもよく、経口的又は非経口的に投与することができ、例えば粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射により非経口投与することができる他、スプレー剤の型で鼻孔内投与することもできるが、注射や点滴による非経口投与を好適に例示することができる。

[0028] 本発明のワクチン療法キットや本発明のワクチン療法の効果増強剤は、a) 対象の体内に β -リン酸三カルシウムを移植するステップ；及び b) 対象にワクチン組成物を投与するステップ；を備えたワクチン組成物によるワクチン療法に用いることもできる。ワクチン組成物は、 β -T C P が移植されると同時、又はその前後に対象に投与され、投与量や投与回数はワクチン組成物の活性の強さ、疾病の種類、患者の体重、投与形態等により適宜選定することができ、例えば好ましくは 1 日あたり 0. 0 0 0 1 ~ 1 0 0 m g / k g (体重)、より好ましくは 0. 0 1 ~ 5 0 m g / k g (体重)、さらに好

ましくは0.1～10mg/kg（体重）を上げることができる。好ましくは本発明の β -TCPが移植されると同時、又はその後にワクチン組成物を対象への投与を開始し、一定期間ごとに数回、好ましくは、2週ごとに、計2回投与する例を上げることができる。また、本発明におけるワクチン組成物はコンプリートアジュバントやインコンプリートアジュバントを含んでもよく、例えばフロイントのコンプリートアジュバントやフロイントのインコンプリートアジュバントの併用を上げることにもできる。また、本発明におけるワクチン組成物は、ワクチン組成物以外の他の薬剤、サプリメントなどの投与と併用してもよく、手術などの外科療法と併用することにもできる。

[0029] 本発明のワクチン組成物を用いるワクチン療法の効果増強剤は、ワクチン組成物の投与のみによるワクチン療法と、コントロール又は本発明の β -TCP組成物及びワクチン組成物の投与を併用した場合の治療効果とを比較した場合に、 β -TCP組成物を併用した方が高い治療効果が得られるという効果を有する。例えば腫瘍マーカーの値の減少や、例えば腫瘍サイズを指標として比較した場合に、ワクチン療法のみ比べ、ワクチン療法に加えて β -TCPを併用した方が、腫瘍サイズが縮小、あるいは増加しないことを調べることにより、本発明の効果を具体的に確認することができる。

[0030] また本発明は、 β -TCPを移植したマウスを、新たなワクチン組成物の効果の検証や、候補物質の段階では薬効の弱いワクチン組成物のスクリーニングにも用いることもできるという効果を有する。例えば、抗腫瘍効果の検証には多くの場合ヌードマウスが用いられるが、ヌードマウスでは抗腫瘍効果をもたらす可能性のあるエフェクター細胞がNK細胞だけであるのに対し、本発明における実験系では正常なマウスを用いて、NK細胞だけでなくT細胞及びB細胞の関与についても検討できるため、よりヒトの臨床（がん患者など）に近い試験を行うことができる。

[0031] 以下に、具体例によってさらに説明する。

〔 β -TCPを用いたワクチン組成物によるワクチン療法〕

<具体例1>

例えば、以下の実験群を設定することができる。

1 群：対照群

2 群：アジュバント投与群

3 群： β -TCP 移植群

4 群：アジュバント投与+ β -TCP 移植群

5 群：アジュバント-OVA ペプチド投与群

6 群：アジュバント-OVA ペプチド投与+ β -TCP 移植群

[0032] (1) 6 週齢の雄性マウス (C57BL/6) 側腹部皮下に ϕ 5 mm $\times$ 厚さ 2 mm の円板状の β -TCP の錠剤 (3, 4, 6 群) または同サイズのプラスチック片 (1, 2, 5 群) を移植する。

(2) 7 日後、移植した β -TCP 錠剤またはプラスチック片の近傍にアジュバント FCA (Freund' s complete adjuvant) 又は FIA (Freund' s incomplete adjuvant) に懸濁した OVA (オバルブミン) ペプチド (アミノ酸配列: S I I N F E K L) 1 ~ 100 μ g を皮内投与する。

(3) 14 日後、上記 (2) の手順を再度繰り返す。

(4) 21 日後、移植及び投与を行った反対側の側腹部皮下に $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 個のマウス・リンパ腫細胞 E.G7-OVA (ATCC 社より購入) を移植し、腫瘍の形成及び生存期間について観察する。

[0033] 本実験で使用する E.G7-OVA 細胞は、遺伝子導入によりニワトリ・オバルブミンを発現し、MHC クラス I 上に OVA ペプチドを提示することが知られている。OVA ペプチドによる免疫が有効に作用した場合、マウス体内には OVA ペプチド特異的な細胞傷害性 T 細胞が誘導され、免疫後に E.G7-OVA を移植しても腫瘍の生着は阻止される。したがって、1 ~ 5 群に比べて 6 群において腫瘍の形成が抑えられれば、 β -TCP はワクチン・アジュバンドとして機能したと評価することができる。

[0034] <具体例 2>

本実験では例えば以下の実験群を設定することができる。

1 群：対照群

2群：アジュバント投与群

3群： β -TCP移植群

4群：アジュバント投与+ β -TCP移植群

5群：アジュバント-TRP-2ペプチド投与群

6群：アジュバント-TRP-2ペプチド投与+ β -TCP移植群

[0035] (1) 6週齢の雄性マウス(C57BL/6)側腹部皮下に ϕ 5mm×厚さ2mmの円板状の β -TCPの錠剤(3, 4, 6群)または同サイズのプラスチック片(1, 2, 5群)を移植する。

(2) 7日後、移植した β -TCP錠剤またはプラスチック片の近傍にアジュバントFCA (Freund's complete adjuvant) 又はFIA (Freund's incomplete adjuvant) に懸濁したTRP-2 (Tyrosinase-related protein 2) ペプチド(アミノ酸配列: VYDFFVWL) 1~100 μ gを皮内投与する。

(3) 14日後、上記(2)の手順を再度繰り返す。

(4) 21日後、移植及び投与を行った反対側の側腹部皮下に $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 個のマウス・メラノーマ細胞B16(ATCC社より購入)を移植し、腫瘍の形成及び生存期間について観察する。1~5群に比べて6群において腫瘍の形成が抑えられれば、 β -TCPはワクチン・アジュバンドとして機能したと評価することができる。

[0036] <具体例3>

本実験では例えば以下の実験群を設定することができる。

1群：対照群

2群：アジュバント投与群

3群： β -TCP移植群

4群：アジュバント投与+ β -TCP移植群

5群：アジュバント-WT1ペプチド投与群

6群：アジュバント-WT1ペプチド投与+ β -TCP移植群

[0037] (1) 6週齢の雄性マウス(C57BL/6)側腹部皮下に ϕ 5mm×厚さ2mmの

円板状の β -TCPの錠剤（3，4，6群）または同サイズのプラスチック片（1，2，5群）を移植する。

（2）7日後、移植した β -TCP錠剤またはプラスチック片の近傍にアジュバントFCA（Freund's complete adjuvant）又はFIA（Freund's incomplete adjuvant）に懸濁したWT1ペプチド（アミノ酸配列：RMFPNAPYL）1～100 μ gを皮内投与する。

（3）14日後、上記（2）の手順を再度繰り返す。

（4）21日後、移植及び投与を行った反対側の側腹部皮下に $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 個のmWT1-C1498（WT1発現マウス白血病細胞；ATCC社より購入）を移植し、腫瘍の形成及び生存期間について観察する。1～5群に比べて6群において腫瘍の形成が抑えられれば、 β -TCPはワクチン・アジュバンドとして機能したと評価することができる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

[0038] [β -TCPの作製方法]

β -TCPブロックは、人工骨として製品を購入することもできるが、原料の β -TCPと水、界面活性剤、発泡剤を混ぜ、焼結することにより作製することもできる。かかる β -TCPブロックは、気孔率75%や気孔率60%であった。また、 β -TCP粉末や β -TCP顆粒については、前記気孔率75%の β -TCPブロックを粉砕し、篩にかけて粒径75～105 μ mの β -TCP粉末（気孔率：60～70%）を得た。また、同様に篩にかけて得られた25～75 μ mの β -TCP（気孔率：40～50%）とPBS溶液を混合後、すぐに液体上部4分の3部分の液体を採取し、1000rpmにて3分間の遠心操作で沈殿から0.05～25 μ mの β -TCPミクロン顆粒（気孔率：35～50%）を、上清から0.05～5 μ mのミクロン顆粒を採取した（気孔率：20～30%）。また、リン酸水素カルシウム、炭酸カルシウム及び水を適切な割合で混合してスラリーを調製し、調製し

たスラリーを摩砕しながら反応させた後に乾燥させ、得られた固形物を粉砕して仮焼することで β -TCP粉末が得られ、その粉末を圧縮形成することにより $\phi 5 \times 2$ mm錠剤に賦形し、 $600 \sim 1500^\circ\text{C}$ で30時間焼結することで、円板状の β -TCP緻密体錠剤を作製した（気孔率：0.1～20%）。また、 β -TCPの原料粉末30 g、界面活性剤6.0 mL、水10 mLとを遠心管に注入し、250 rpmで4分間処理することで脱泡処理をし、型に注入して自然乾燥させ、離型後、 1300°C にて焼結することで、 $\phi 0.9 \times 10$ mmの柱状の β -TCP緻密体棒剤を作製した（気孔率：10～30%）。なお、作製した各 β -TCPの気孔率は、水銀法にて、初期圧に対応する直径約 $180 \mu\text{m}$ の細孔にまで水銀が圧入された時の試料体積に対する値として測定された。

[0039] 作製した β -TCP顆粒（サイズ $25 \sim 75 \mu\text{m}$ ）と免疫細胞の結合を走査型電子顕微鏡にて観察した結果を図1に示す。また、作製した β -TCP緻密体錠剤、及び緻密体棒剤を、走査型電子顕微鏡にて観察した結果を図2、図3に示す。また、 β -TCP緻密体を皮下に移植した正常マウスから組織サンプルを採取し、HE染色し、顕微鏡にて観察した結果を図4に示す。リンパ球が集積し、天然のリンパ節と似た構造となっていることがわかった。また、サイズ $0.05 \sim 105 \mu\text{m}$ の β -TCP顆粒（気孔率0～70%）を皮下に移植したマウスから組織サンプルを採取し、HE染色し、顕微鏡にて観察した結果を図5に示す。サイズ $75 \mu\text{m}$ 以上の β -TCP顆粒はマクロファージを誘導し（ $N=13$ ）、 $75 \mu\text{m}$ 以下の顆粒はリンパ球を集め（ $N=11$ ）、サイズ $0.05 \sim 25 \mu\text{m}$ の微小顆粒はリンパ球集塊を形成した。また、 $\phi 5 \times 2$ mmの β -TCP緻密体（気孔率：18%）を皮下に移植したマウスの組織サンプルを抗CD45R抗体、抗CD3抗体、抗CD49b抗体、抗CD11c抗体、抗F4/80R抗体、又は抗D2-40抗体を用いて、それぞれB細胞、T細胞、NK細胞、樹状細胞、マクロファージ、リンパ管を免疫組織染色して顕微鏡にて観察した。結果を図6～図11に示す。以上の結果から、皮下に移植された焼結により緻密化した β -TC

Pは、リンパ球（B細胞、T細胞、NK細胞）、樹状細胞、マクロファージを誘導し、人工リンパ節として利用できることが確認された。抗腫瘍効果の検証には、多くの場合ヌードマウスが用いられる。しかしながらヌードマウスでは抗腫瘍効果をもたらす可能性のあるエフェクター細胞がNK細胞だけであるのに対し、本発明の β -TCPを移植したマウスは、T細胞及びB細胞の関与についても検討できるため、よりヒトの臨床（癌患者）に近い状態での試験を行うことができることが確認できた。

[0040] [β -TCPを用いたワクチン組成物によるワクチン療法：その1]

(1) ワクチンの実験系には、C57BL/6系統のマウスとトリ・オバルブミンを発現するマウスのリンパ腫細胞であるE.G7-OVA（ATCC社より購入）を用いる腫瘍モデル実験系を用いた。この系を用いて、以下の3群を設定した。

- 1) コントロール群：無処置動物にE.G7-OVAを移植した群
- 2) OVA投与群：OVA蛋白を投与後にE.G7-OVAを移植した群
- 3) OVA+TCP群：TCPを移植、及びOVA蛋白を投与後にE.G7-OVAを移植した群

6週齢の雄性マウス（C57BL/6）側腹部皮下に ϕ 5 mm $\times$ 厚さ 2 mmの円板状の β -TCP緻密体（気孔率：0.1～12%）の錠剤を移植した（OVA+TCP群）。

(2) 7日後、移植した β -TCP錠剤周囲の皮内（OVA+TCP群）または側腹部皮内（OVA投与群）に100 μ gのOVA蛋白を投与した。

(3) 14日後、上記(2)の手順を再度繰り返した。

(4) 21日後、側腹部皮下に 1×10^5 個のE.G7-OVA細胞を移植し、腫瘍の形成及び増殖について観察した。

結果を図12に示す。図12中の*は、 β -TCP移植後にOVA蛋白で免疫したOVA+TCP群では、実験開始42日後及び45日後においてコントロール群に比べて有意に腫瘍増殖が抑制されたことを示す（t-test、 $p < 0.05$ ）。本実験で使用するE.G7-OVA細胞は、遺伝子導入によりニフトリ・オバルブミンを発現し、MHCクラスI上にOVAペプチドを提示することから

、３）群においてはＯＶＡペプチドによる免疫が有効に作用し、マウス体内でＯＶＡペプチド特異的な細胞傷害性Ｔ細胞が誘導され、腫瘍増殖が抑制されたと考えられる。

産業上の利用可能性

[0041] 本発明は、ワクチン療法や、ワクチン療法の補助療法、腫瘍治療法などの医療分野や、アジュバントなどの分野などに好適に利用することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 対象の体内に移植されて用いられる β -リン酸三カルシウムを有効成分とする組成物と、ワクチン組成物とを備えたワクチン療法キット。
- [請求項2] 体内が、皮内、皮下、又は筋肉内であることを特徴とする請求項1記載のワクチン療法キット。
- [請求項3] β -リン酸三カルシウムが病変近傍に移植されることを特徴とする請求項1又は2記載のワクチン療法キット。
- [請求項4] 病変近傍が、病変から0.1～15cmの距離にある領域であることを特徴とする請求項3記載のワクチン療法キット。
- [請求項5] ワクチン組成物が、がん特異的抗原ワクチンであることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載のワクチン療法キット。
- [請求項6] がん特異的抗原ワクチンが、TRP-2 (Tyrosinase-related protein 2)、WT1 (Wilms tumor 1)、オバルブミン (OVA)、又はがん細胞抽出液 (Tumor lysate) 由来の抗原ペプチド又はタンパク質であることを特徴とする請求項1～6のいずれか記載のワクチン療法キット。
- [請求項7] β -リン酸三カルシウムが、気孔率50%以下の緻密体であることを特徴とする請求項1～6のいずれか記載のワクチン療法キット。
- [請求項8] β -リン酸三カルシウムが、T細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞、及びマクロファージを活性化、誘導、又は集積することを特徴とする請求項7記載のワクチン療法キット。
- [請求項9] β -リン酸三カルシウムが、錠剤又は柱状体であることを特徴とする請求項1～8のいずれか記載のワクチン療法キット。
- [請求項10] β -リン酸三カルシウムが、粒径0.05～25 μ mの粒子又は顆粒であることを特徴とする請求項1～8のいずれか記載のワクチン療法キット。
- [請求項11] 対象の体内に移植されて用いられる β -リン酸三カルシウムを有効

成分とする、ワクチン組成物を用いるワクチン療法の効果増強剤。

[請求項12] 体内が、皮内、皮下、又は筋肉内であることを特徴とする請求項1記載のワクチン療法の効果増強剤。

[請求項13] β -リン酸三カルシウムが病変近傍に移植されることを特徴とする請求項11又は12記載のワクチン療法の効果増強剤。

[請求項14] 病変近傍が、病変から0.1～15cmの距離にある領域であることを特徴とする請求項13記載のワクチン療法の効果増強剤。

[請求項15] ワクチン組成物が、がん特異的抗原ワクチンであることを特徴とする請求項11～14のいずれか記載のワクチン療法の効果増強剤。

[請求項16] がん特異的抗原ワクチンが、TRP-2 (Tyrosinase-related protein 2)、WT1 (Wilms tumor 1)、オバルブミン (OVA)、又はがん細胞抽出液 (Tumor lysate) 由来の抗原ペプチド又はタンパク質であることを特徴とする請求項15記載のワクチン療法の効果増強剤。

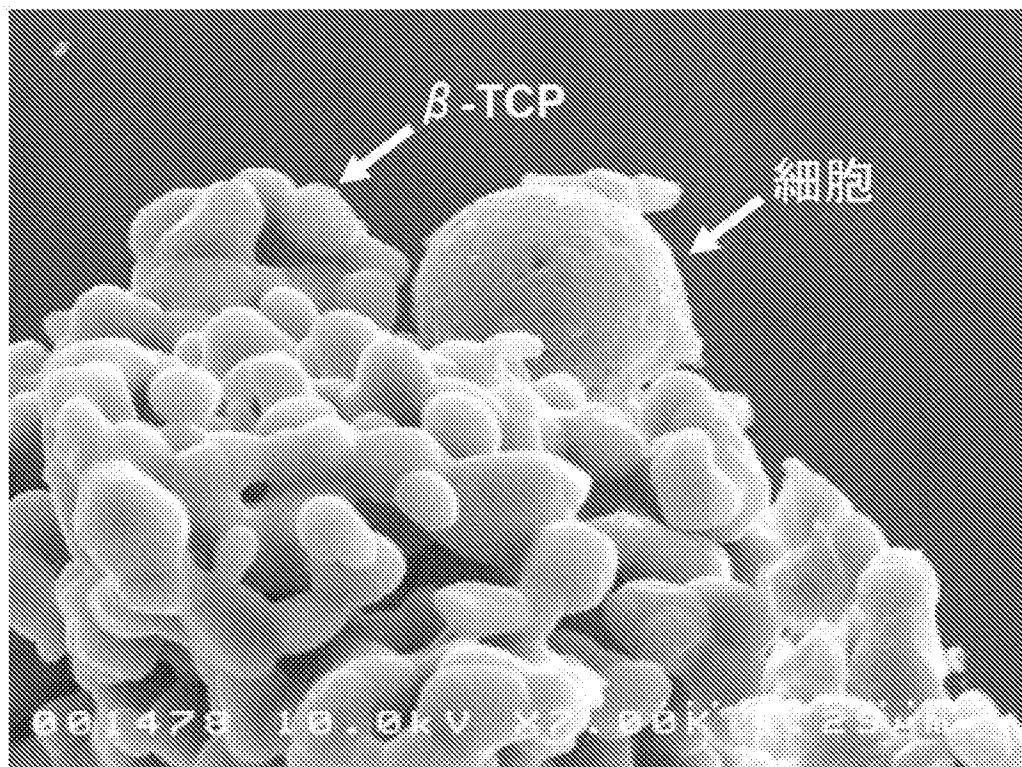
[請求項17] β -リン酸三カルシウムが、気孔率50%以下の緻密体であることを特徴とする請求項11～16のいずれか記載のワクチン療法の効果増強剤。

[請求項18] β -リン酸三カルシウムが、T細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞、及びマクロファージを活性化、誘導、又は集積することを特徴とする請求項17記載のワクチン療法の効果増強剤。

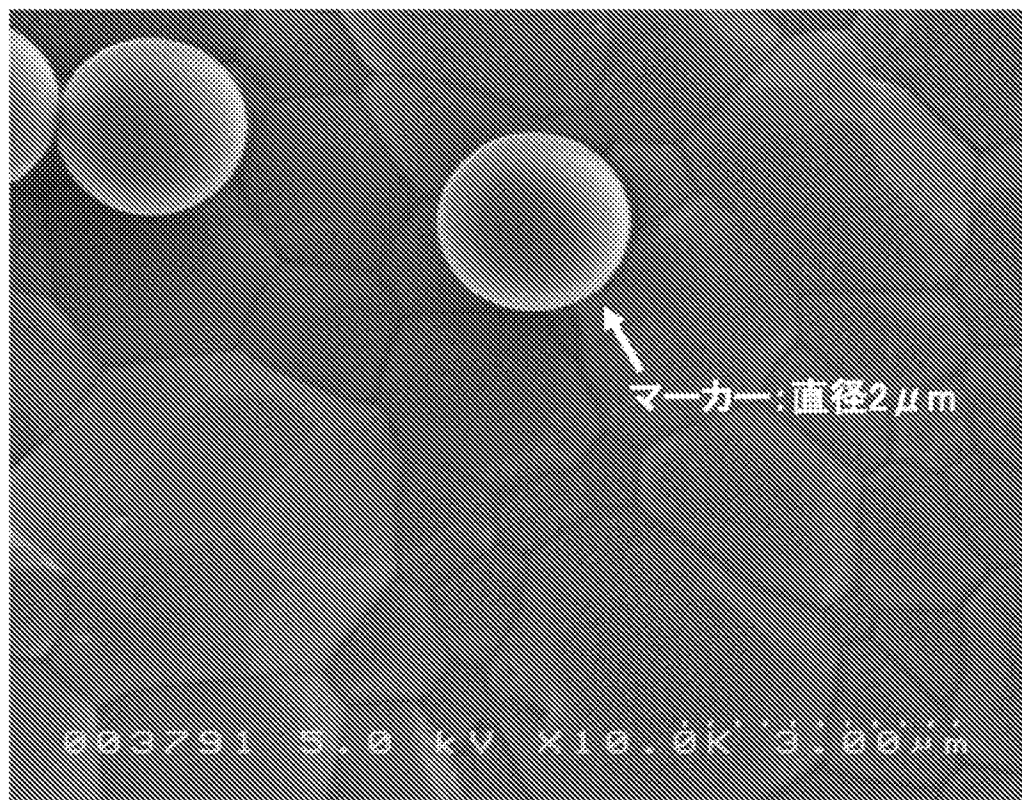
[請求項19] β -リン酸三カルシウムが、錠剤又は柱状体であることを特徴とする請求項11～18のいずれか記載のワクチン療法の効果増強剤。

[請求項20] β -リン酸三カルシウムが、粒径0.05～25 μ mの粒子又は顆粒であることを特徴とする請求項11～18のいずれか記載のワクチン療法の効果増強剤。

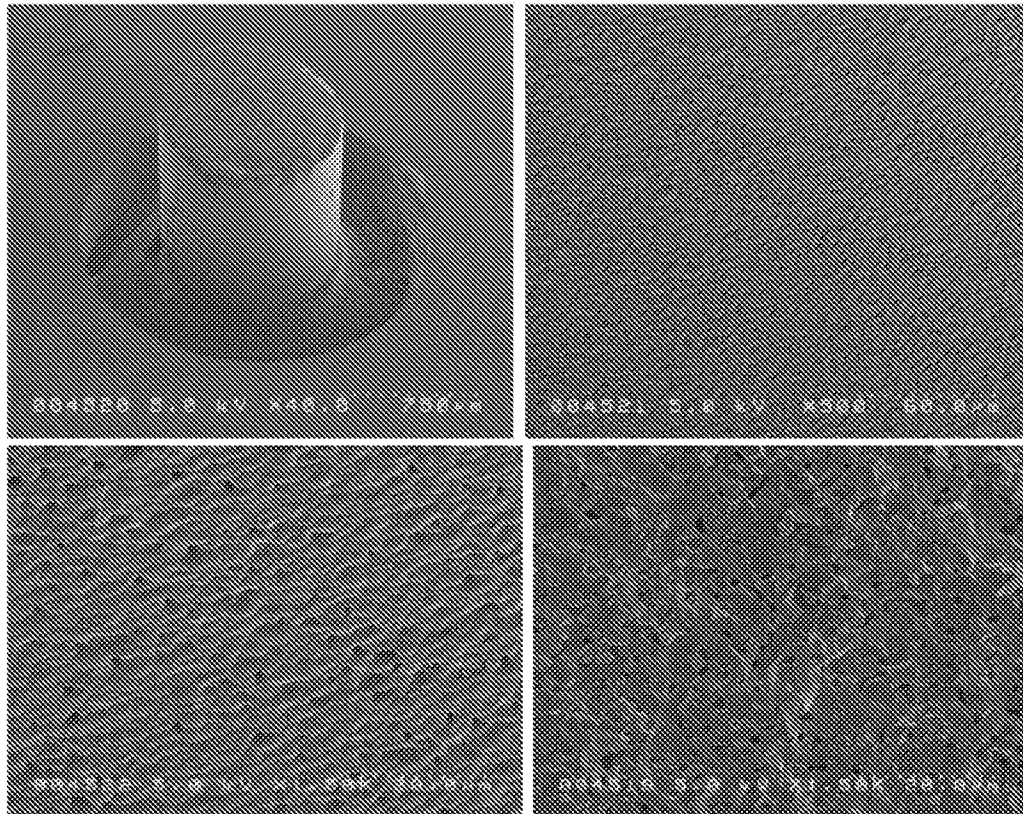
[図1]



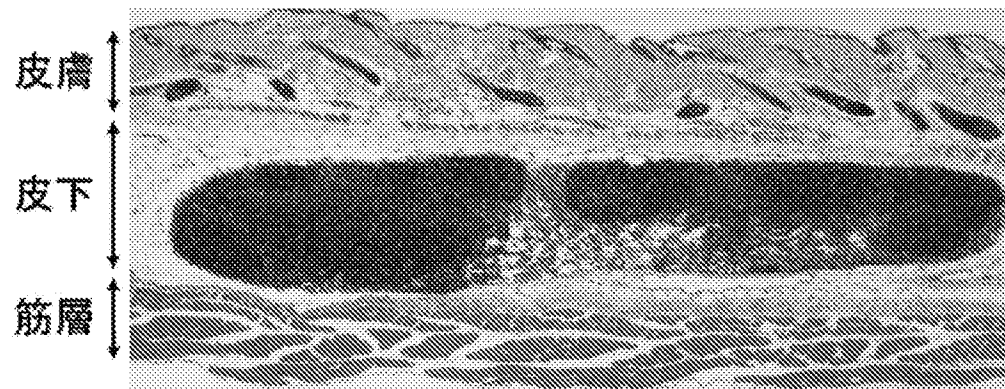
[図2]



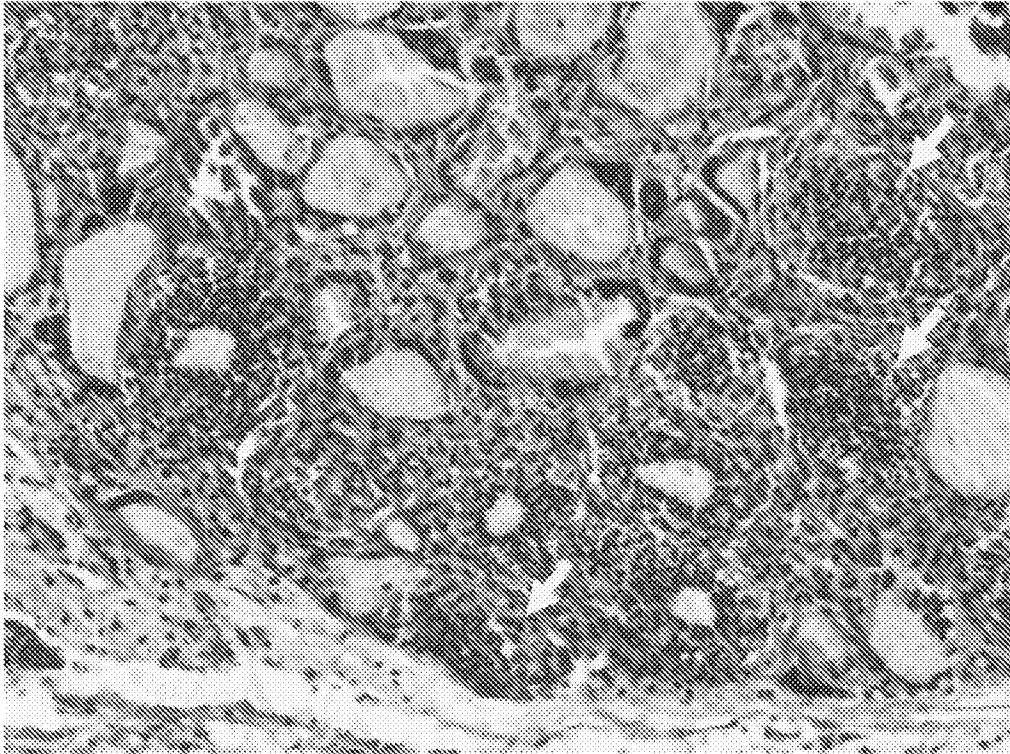
[図3]



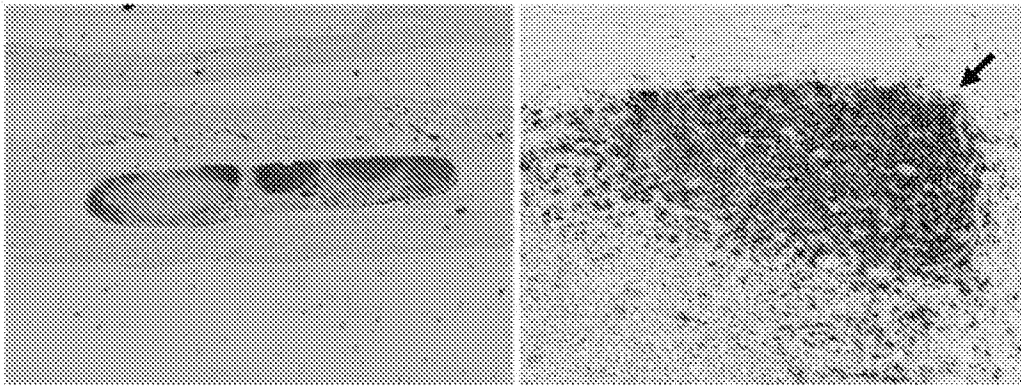
[図4]



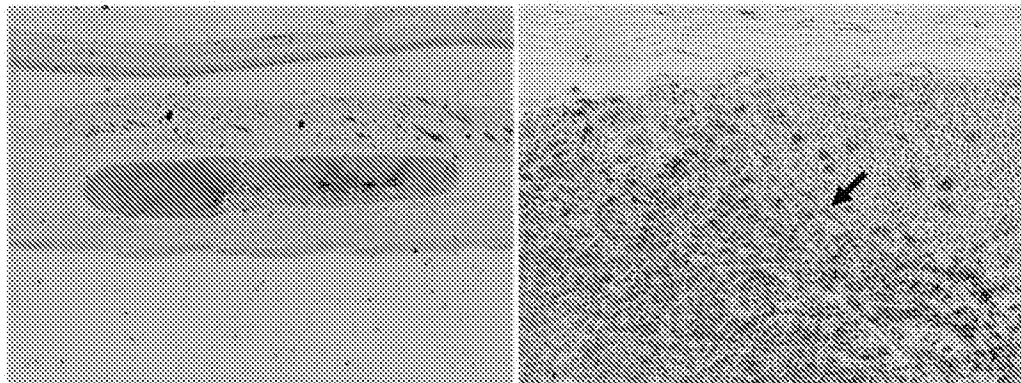
[図5]



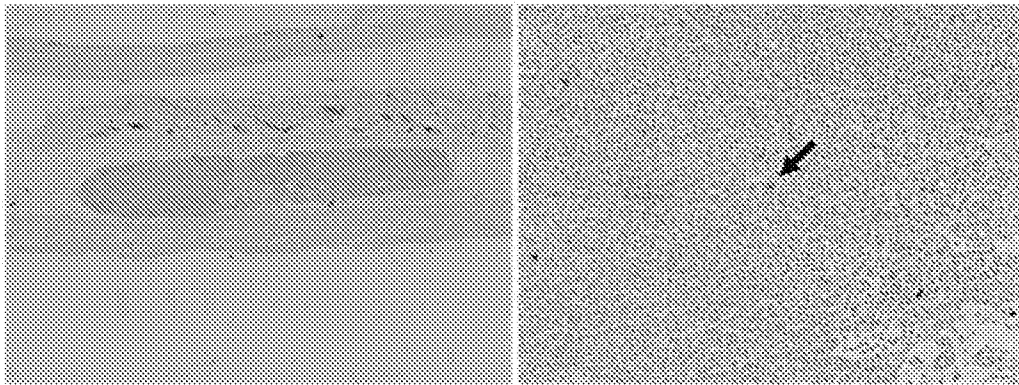
[図6]



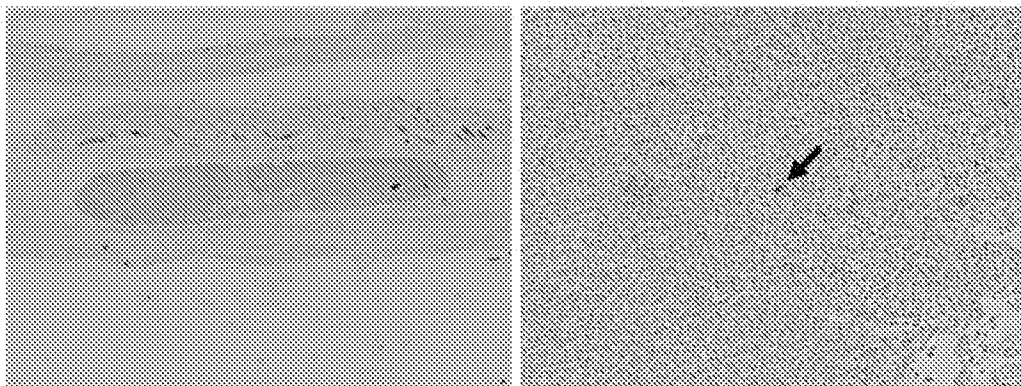
[図7]



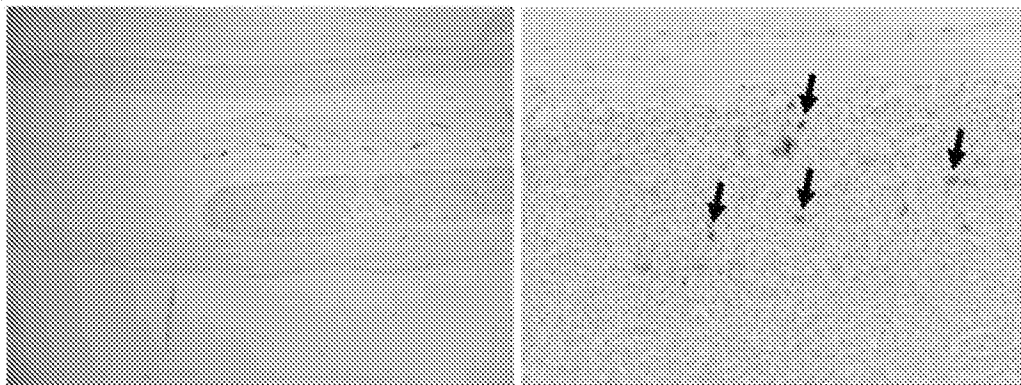
[図8]



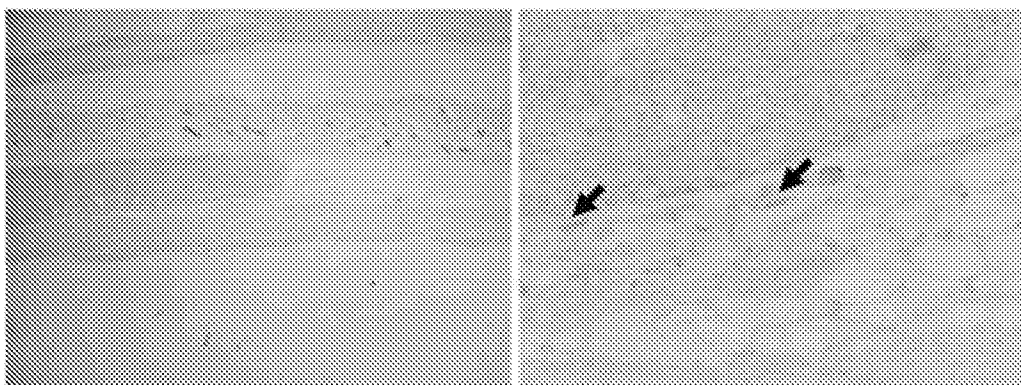
[図9]



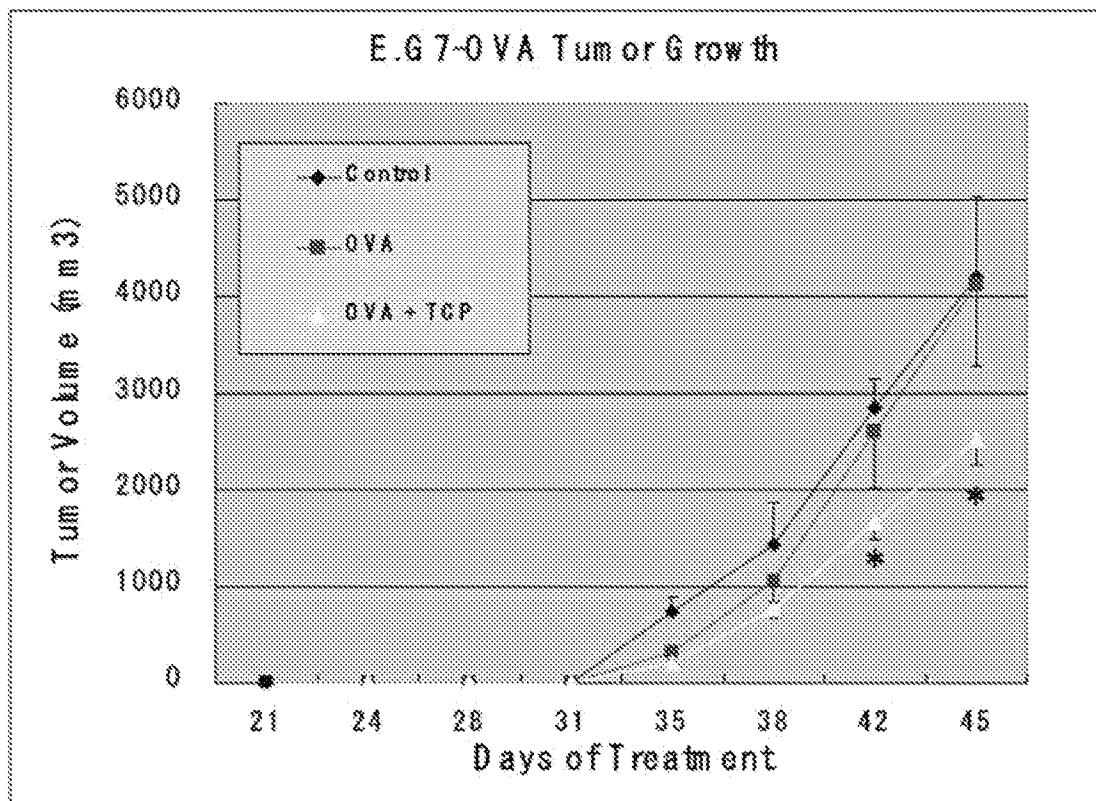
[図10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/000584

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K33/42(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61K39/39(2006.01)i, A61K47/02(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

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)

A61K33/42, A61K39/00, A61K39/39, A61K47/02, A61L27/00, A61P35/00, A61P43/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2009-542681 A (Biomimetic Therapeutics, Inc.), 03 December 2009 (03.12.2009), entire text & US 2008/0027470 A1 & EP 2049145 A & WO 2008/005427 A2 & CA 2656278 A & AU 2007269712 A	1, 3, 10, 11, 13, 20 2, 4-9, 12, 14-19
Y	JP 10-511957 A (The Board of Regents of the University of Michigan), 17 November 1998 (17.11.1998), entire text & EP 805678 A & WO 1996/020698 A2 & DE 69630514 D & AU 4755696 A & CA 2207961 A & AT 252894 T	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"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

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 April, 2012 (24.04.12)

Date of mailing of the international search report
01 May, 2012 (01.05.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/000584

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2007-217307 A (Meiji University), 30 August 2007 (30.08.2007), entire text (Family: none)	1-20
Y	JP 2010-126434 A (Olympus Corp.), 10 June 2010 (10.06.2010), entire text (Family: none)	1-20
Y	JP 2010-47603 A (International Institute of Cancer Immunology, Inc.), 04 March 2010 (04.03.2010), entire text & US 2006/0217297 A1 & US 2010/0292164 A1 & EP 1584627 A1 & EP 2154145 A2 & WO 2004/063217 A1 & DE 602004023476 D & CA 2513701 A & BR 406800 A & KR 10-2005-0098863 A & CN 1756763 A & BRA PI0406800 & AT 444969 T & AU 2004204031 A	1-20
Y	JP 2007-515452 A (Pharmexa A/S), 14 June 2007 (14.06.2007), entire text & US 2007/0148220 A1 & EP 1547581 A1 & EP 1696883 A & WO 2005/063201 A2 & CA 2544895 A & AU 2004308643 A	1-20
Y	JP 2007-637 A (Heraeus Kulzer GmbH), 11 January 2007 (11.01.2007), entire text & US 2007/0009557 A1 & EP 1745806 A2 & DE 102005029206 A & DE 502006004425 D & CN 1883722 A & CA 2549305 A & BRA PI0602316	1-20

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K33/42 (2006.01)i, A61K39/00 (2006.01)i, A61K39/39 (2006.01)i, A61K47/02 (2006.01)i,
A61L27/00 (2006.01)i, A61P35/00 (2006.01)i, A61P43/00 (2006.01)i

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 (I P C))

Int.Cl. A61K33/42, A61K39/00, A61K39/39, A61K47/02, A61L27/00, A61P35/00, A61P43/00

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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

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 請求項の番号
X	JP 2009-542681 A (バイオミメティック セラピューティクス, イ ンコーポレイテッド) 2009.12.03, 全文	1, 3, 10, 11, 13, 20
A	& US 2008/0027470 A1 & EP 2049145 A & WO 2008/005427 A2 & CA 2656278 A & AU 2007269712 A	2, 4-9, 12, 14-19
Y	JP 10-511957 A (ザ ボード オブ リージェンツ オブ ザ ユ ニヴァーシティ オブ ミシガン) 1998.11.17, 全文 & EP 805678 A & WO 1996/020698 A2 & DE 69630514 D & AU 4755696 A & CA 2207961 A & AT 252894 T	1-20

☒ 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

の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

2 4 . 0 4 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

0 1 . 0 5 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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)

浅野 美奈

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

4 C

9 3 1 2

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 請求項の番号
Y	JP 2007-217307 A (学校法人明治大学) 2007. 08. 30, 全文 (ファミリーなし)	1-20
Y	JP 2010-126434 A (オリンパス株式会社) 2010. 06. 10, 全文 (ファミリーなし)	1-20
Y	JP 2010-47603 A (株式会社癌免疫研究所) 2010. 03. 04, 全文 & US 2006/0217297 A1 & US 2010/0292164 A1 & EP 1584627 A1 & EP 2154145 A2 & WO 2004/063217 A1 & DE 602004023476 D & CA 2513701 A & BR 406800 A & KR 10-2005-0098863 A & CN 1756763 A & BRA PI0406800 & AT 444969 T & AU 2004204031 A	1-20
Y	JP 2007-515452 A (ファーマクサ エイ/エス) 2007. 06. 14, 全文 & US 2007/0148220 A1 & EP 1547581 A1 & EP 1696883 A & WO 2005/063201 A2 & CA 2544895 A & AU 2004308643 A	1-20
Y	JP 2007-637 A (ヘレーウス クルツァー ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング) 2007. 01. 11, 全文 & US 2007/0009557 A1 & EP 1745806 A2 & DE 102005029206 A & DE 502006004425 D & CN 1883722 A & CA 2549305 A & BRA PI0602316	1-20