

(2)表

表 1. 日本における悪性黒色腫の UICC 病期別生存率\*

UICC 病期 (患者数)	5 年生存率	10 年生存率
病期 I (106)	98%	95%
病期 II (150)	84%	76%
病期 IIIA** (110)	61%	59%
病期 IIIB** (93)	40%	38%
病期 IV (64)	12%	0%

\* 日本皮膚悪性腫瘍学会予後統計調査委員会のデータ

\*\* IIIA: T4N0M0, IIIB: anyTN1,2M0

表 2. 遺伝子製剤 IAB-1 の規格

試験項目	規格
性状	白色の懸濁液(液剤)、白色の氷塊(凍結剤)、あるいは白色の塊ないし粉末(凍結乾燥剤)
確認試験	257~261nm に極大吸収
pH	7.0~7.6
浸透圧比	0.8~1.2(液剤)、1.0~1.4(凍結剤または凍結乾燥剤)
純度試験 (類縁物質)	15%以下
発熱性物質試験	陰性
無菌試験	適合
生物活性 (pDRSV-IFN $\beta$ 15ng 当たり)	
ヒト $\beta$ 型インターフェロン産生量	150 国際単位/ml 以上
細胞増殖抑制率	30%以上
定量	
pDRSV-IFN $\beta$	1mg/ml 以上(液剤)、0.10~0.17mg/ml(凍結剤または凍結乾燥剤)
リポソーム膜成分	
TMAG	3.6~7.2mg/mg-DNA
DLPC	7.8~13.8mg/mg-DNA
DOPE	9.0~16.8mg/mg-DNA

表3. 培養ヒト悪性黒色細胞へのリポソーム包埋ヒトインターフェロン $\beta$  遺伝子導入によるインターフェロン $\beta$ の産生量\*

Cell lines	Incubation time (days)		
	0	3	6
RPM-EP	ND	30.6 $\pm$ 4.3 (IU/ml)	67.3 $\pm$ 8.4
RPM-MC	ND	10.5 $\pm$ 2.4	12.2 $\pm$ 3.2
G361	ND	22.3 $\pm$ 5.2	28.5 $\pm$ 6.7
MM-AN	ND	13.5 $\pm$ 1.9	21.7 $\pm$ 4.2
Colo38	ND	4.0 $\pm$ 1.3	3.8 $\pm$ 0.9

\*各ウェルに  $5 \times 10^4$ /ml の細胞を播き、pSV2IFN $\beta$  (15nmol/ml lipid, 0.6 $\mu$ g/ml DNA)を加え、各検出日における培養液中のヒトインターフェロン $\beta$ 濃度を測定した（5回の実験の平均値）。ND: not detectable

表4. リポソーム包埋ヒトインターフェロン $\beta$ 遺伝子導入による培養悪性  
 黒色細胞の増殖抑制効果\*

Cell lines	Control			Liposome		
	Incubation time (days)			Incubation time (days)		
	0	3	6	0	3	6
RPM-EP	4.8 $\pm$ 0.6	10.3 $\pm$ 1.1	18.7 $\pm$ 0.9	4.8 $\pm$ 0.6	5.0 $\pm$ 1.3	1.5 $\pm$ 0.6
RPM-MC	4.5 $\pm$ 0.7	8.4 $\pm$ 0.9	16.4 $\pm$ 2.1	4.5 $\pm$ 0.7	5.5 $\pm$ 1.1	2.8 $\pm$ 0.4
G361	5.1 $\pm$ 0.3	10.8 $\pm$ 1.9	18.4 $\pm$ 3.0	5.1 $\pm$ 0.3	4.8 $\pm$ 0.7	1.4 $\pm$ 0.2
MM-AN	4.5 $\pm$ 0.7	8.2 $\pm$ 1.6	14.6 $\pm$ 2.7	4.5 $\pm$ 0.7	4.0 $\pm$ 1.1	3.3 $\pm$ 1.2
Colo38	4.4 $\pm$ 0.7	6.4 $\pm$ 0.7	9.1 $\pm$ 2.0	4.4 $\pm$ 0.7	4.2 $\pm$ 0.8	2.6 $\pm$ 0.9

\*各ウェルに播いた  $5 \times 10^4$  cells/ml の悪性黒色腫細胞にリポソーム包埋ヒト $\beta$ 型遺伝子 pSV2IFN $\beta$  (15nmol/ml lipid, 0.3  $\mu$ g/ml DNA) を作用させ、各試験日における細胞数をトリパンブルー法で計測（5回の実験の平均値）。

表5. 悪性黒色腫に対して行われている遺伝子治療の種類と件数

対象とされた遺伝子	件数
IL-2	13
IL-2/NeoR	3
IL-2/GM-CSF	3
IL-4	4
IL-6/sIL-6R	1
IL-7/TK/HyR	1
IL-7/IL-2	1
IL-7/IL-12/GM-CSF	3
IL-12	2
IL-12/NeoR	2
IL-12/CD80(B7-1)	2
TK	3
TK/HyR	1
Tyrosinase	2
gp100	4
gp100/GM-CSF	1
MART-1	4
MART-1/gp100	2
HLA-A2, etc	1
HLA-B7	2
HLA-B7/ $\beta$ 2m	12
HLA-B7/ $\beta$ 2m/IL-2	1
CD80(B7-1)	2
GM-CSF	6
IFN- $\gamma$	3
TNF/NeoR	1
Enterotoxin B/IL-2	1
ICP34.5deleted	1

(2001年5月現在)

(3) ㊦

図1. ヒトβ型インターフェロンcDNAを含むプラスミドの全塩基配列

```

      10      20      30      40      50      60
GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG

      70      80      90     100     110     120
CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGCTCCCT GCTTGTGTGTT GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG

     130     140     150     160     170     180
CGAGCAAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAA GGCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC

     190     200     210     220     230     240
TTAGGGTTAG GCGTTTTGCG CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTATCTGAG

     250     260     270     280     290     300
GGGACTAGGG TGTGTTTAGG CGAAAAGCGG GGCTTCGGTT GTACGCGGTT AGGAGTCCCC

     310     320     330     340     350     360
TCAGGATATA GTAGTTTCGC TTTTGCATAG GGAGGGGGAA ATGTAGTCTT ATGCAATACT

     370     380     390     400     410     420
CTTGTAGTCT TGCAACATGG TAACGATGAG TTAGCAACAT GCCTTACAAG GAGAGAAAAA

     430     440     450     460     470     480
GCACCGTGCA TGCCGATTGG TGGAAGTAAG GTGGTACGAT CGTGCCTTAT TAGGAAGGCA

     490     500     510     520     530     540
ACAGACGGGT CTGACATGGA TTGGACGAAC CACTGAATTC CGCATTGCGAG AGATATTGTA

     550     560     570     580     590     600
TTAAGTGCC TAGCTCGATA CAATAAACGC CATTTGACCA TTCACCACAT TGGTGTGCAC

     610     620     630     640     650     660
CTCCAAGCTT GCCTGCAGGT CAACATGACC AACAAGTGTC TCCTCCAAAT TGCTCTCCTG

     670     680     690     700     710     720
TTGTGCTTCT CCACTACAGC TCTTTCCATG AGCTACAACT TGCTTGGATT CCTACAAAGA

     730     740     750     760     770     780
AGCAGCAATT TTCAGTGCA GAAGCTCCTG TGGCAATTGA ATGGGAGGCT TGAATAATTG

     790     800     810     820     830     840
CTCAAGGACA GGATGAACTT TGACATCCCT GAGGAGATTA AGCAGCTGCA GCAGTTCAG

     850     860     870     880     890     900
AAGGAGGACG CCGCATTGAC CATCTATGAG ATGCTCAGA ACATCTTGC TATTTTCTAGA

     910     920     930     940     950     960
CAAGATTCAT CTAGCACTGG CTGGAATGAG ACTATTGTTG AGAACCTCCT GGCTAATGTC

```



970            980            990            1000            1010            1020  
 TATCATCAGA TAAACCATCT GAAGACAGTC CTGGAAGAAA AACTGGAGAA AGAAGATTTC

1030            1040            1050            1060            1070            1080  
 ACCAGGGGAA AACTCATGAG CAGTCTGCAC CTGAAAAGAT ATTATGGGAG GATTCTGCAT

1090            1100            1110            1120            1130            1140  
 TACCTGAAGG CCAAGGAGTA CAGTCACTGT GCCTGGACCA TAGTCAGAGT GGAAATCCTA

1150            1160            1170            0080            1190            1200  
 AGGAACTTTT ACTTCATTAA CAGACTTACA GGTTACCTCC GAAACTGAAG ATCCCCTAGA

1210            1220            1230            1240            1250            1260  
 GCTCGCTGAT CAGCCTCGAC TGTGCCTTCT AGTTGCCAGC CATCTGTTGT TTGCCCTCC

1270            1280            1290            1300            1310            1320  
 CCCGTGCCTT CCTTGACCCF GGAAGGTGCC ACTCCCCTG TCCTTTCCTA ATAAAAAGAG

1330            1340            1350            1360            1370            1380  
 GAAATTGCAT CGCATTGTCT GAGTAGGTGT CATTCTATTG TGGGGGGTGG GGTGGGGCAG

1390            1400            1410            1420            1430            1440  
 GACAGCAAGG GGGAGGATTG GGAAGACAAT AGCAGGCATG CTGGGGATGC GGTGGGCTCT

1450            1460            1470            1480            1490            1500  
 ATGGCTTCTG AGGCCGAAAG AACCCAGCTGG GGCTCGAGGG GGGATCCGTC GACCTCGAGA

1510            1520            1530            1540            1550            1560  
 GCTTGGCGTA ATCATGGTCA TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA TTGTTATCCG CTCACAATTC

1570            1580            1590            1600            1610            1620  
 CACACAACAT ACGAGCCGGA AGCATAAAGT GTAAAGCCTG GGGTGCCTAA TGAGTGAGCT

1630            1640            1650            1660            1670            1680  
 AACTCACATT AATTGCGTTG CGCTCACTGC CCGCTTTCCTA GTCGGGAAAC CTGTCTGTCC

1690            1700            1710            1720            1730            1740  
 AGCTGCATTA ATGAATCGGC CAACGC GCGG GGAGAGGCGG TTTGCGTATT GGGCGCTCTT

1750            1760            1770            1780            1790            1800  
 CCGCTTCTC GCTCACTGAC TCGCTGCGCT CGGTCGTTTC GCTGCGGCGA GCGGTATCAG

1810            1820            1830            1840            1850            1860  
 CTCACTCAAA GCGGTAATA CGGTTATCCA CAGAATCAGG GGATAACGCA GGAAAGAACA

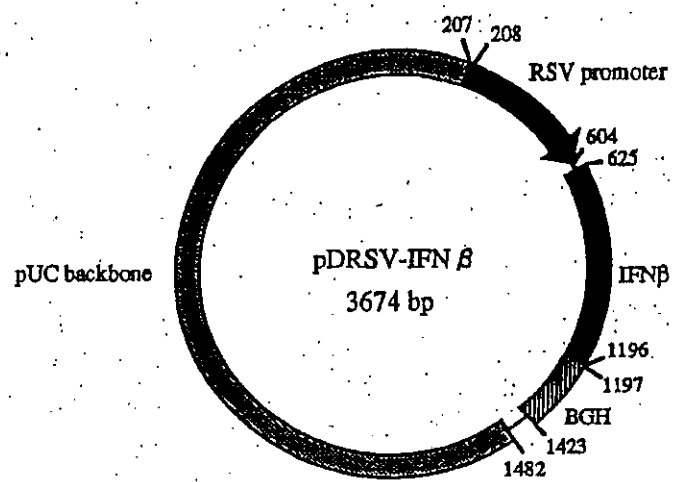
1870            1880            1890            1900            1910            1920  
 TGTGAGCAAA AGGCCAGCAA AAGGCCAGGA ACCGTAAAAA GGCCCGGTTG CTGGCGTTTT

1930            1940            1950            1960            1970            1980  
 TCCATAGGCT CCGCCCCCCT GACGAGCATC ACAAAAATCG ACGCTCAAGT CAGAGGTGGC  
 1990            2000            2010            2020            2030            2040  
 GAAACCCGAC AGGACTATAA AGATACCAGG CGTTTCCCCC TGGAAGCTCC CTCGTGCGCT  
 2050            2060            2070            2080            2090            2100  
 CTCCTGTTCC GACCCGTCCG CTTACCGGAT ACCTGTCCGC CTTTCTCCCT TCGGGAAGCG  
 2110            2120            2130            2140            2450            2160  
 TGGCGCTTTC TCATAGCTCA CGCTGTAGGT ATCTCAGTTC GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA  
 2170            2180            2190            2200            2210            2220  
 AGCTGGGCTG TGTGCACGAA CCCCCCGTTC AGCCCCACCG CTGCGCCTTA TCCGGTAACT  
 2230            2240            2250            2260            2270            2280  
 ATCGTCTTGA GTCCAACCCG GTAAGACACG ACTTATCGCC ACTGGCAGCA GCCACTGGTA  
 2290            2300            2310            2320            2330            2340  
 ACAGGATTAG CAGAGCGAGG TATGTAGGCG GTGCTACAGA GTTCTTGAAG TGGTGGCCTA  
 2350            2360            2370            2380            2390            2400  
 ACTACGGCTA CACTAGAAGA ACAGTATTTG GTATCTGCGC TCTGCTGAAG CCAGTTACCT  
 2410            2420            2430            2440            2450            2460  
 TCGGAAAAAG AGTTGGTAGC TCTTGATCCG GCAAACAAAC CACCGCTGGT AGCGGTGGTT  
 2470            2480            2490            2500            2510            2520  
 TTTTTGTTTG CAAGCAGCAG ATTACGCGCA GAAAAAAGG ATCTCAAGAA GATCCTTTGA  
 2530            2540            2550            2560            2570            2580  
 TCTTTTCTAC GGGGTCTGAC GCTCAGTGGA ACGAAAACCT ACGTTAAGGG ATTTTGGTCA  
 2590            2600            2610            2620            2630            2640  
 TGAGATTATC AAAAAGGATC TTCACCTAGA TCCTTTTAAA TTAAAAATGA AGTTTAAAT  
 2650            2660            2670            2680            2690            2700  
 CAATCTAAAG TATATATGAG TAAACTGGT CTGACAGTTA CCAATGCTTA ATCAGTGAGG  
 2710            2720            2730            2740            2750            2760  
 CACCTATCTC AGCGATCTGT CTATTTTCGTT CATCCATAGT TGCCTGACTC CCCGTCGTGT  
 2770            2780            2790            2800            2810            2820  
 AGATAACTAC GATACGGGAG GGCTTACCAT CTGGCCCCAG TGCTGCAATG ATACCGCGAG  
 2830            2840            2850            2860            2870            2880  
 ACCCAGCTC ACCGGCTCCA GATTTATCAG CAATAAACCA GCCAGCCGGA AGGGCCGAGC  
 2890            2900            0910            2920            2930            2940  
 GCAGAAGTGG TCCTGCAACT TTATCCGCCT CCATCCAGTC TATTAATTGT TGCCGGGAAG

2950            2960            2970            2980            2990            3000  
 CTAGAGTAAG TAGTTCGCCA GTTAATAGTT TGGCAACGT TGTTGCCATT GCTACAGGCA  
  
 3010            3020            3030            3040            3050            3060  
 TCGTGGTGTC ACGCTCGTGC TTGGTATGG CTTTCATTCAG CTCCGGTTCC CAACGATCAA  
  
 3070            3080            3090            3100            3110            3120  
 GGCGAGTTAC ATGATCCCCC ATGTTGTGCA AAAAAGCGGT TAGCTCCTTC GGTCCCTCCGA  
  
 3130            3140            3150            3160            3170            3180  
 TCGTTGTGTC AAGTAAGTTG GCCGCAGTGT TATCACTCAT GGTTATGGCA GCACTGCATA  
  
 3190            3200            3210            3220            3230            3240  
 ATTCTCTTAC TGTCATGCCA TCCGTAAGAT GCTTTTCTGT GACTGGTGAG TACTCAACCA  
  
 3250            3260            3270            3280            3290            3300  
 AGTCATTCTG AGAATAGTGT ATGCGGCGAC CGAGTTGCTC TTGCCCCGGC TCAATACGGG  
  
 3310            3320            3330            3340            3350            3360  
 ATAATACCGC GCCACATAGC AGAACTTTAA AAGTGCTCAT CATTGGAAAA CGTTCCTTCGG  
  
 3370            3380            3390            3400            3410            3420  
 GGCGAAAACCT CTCAAGGATC TTACCGCTGT TGAGATCCAG TTCGATGTAA CCCACTCGTG  
  
 3430            3440            3450            3460            3470            3480  
 CACCCAACTG ATCTTCAGCA TCTTTTACTT TCACCAGCGT TTCTGGGTGA GCAAAAACAG  
  
 3490            3500            3510            3520            3530            3540  
 GAAGGCAAAA TGCCGCAAAA AAGGGAATAA GGGCGACACG GAAATGTTGA ATACTCATA  
  
 3550            3560            3570            3580            3590            3600  
 TCTTCCTTTT TCAATATTAT TGAAGCATT ATCAGGGTTA TTGTCTCATG AGCGGATACA  
  
 3610            3620            3630            3640            3650            3660  
 TATTGGAATG TATTTAGAAA AATAAACAAA TAGGGGTTCC GCGCACATTT CCCCAGAAA  
  
 3670            3680  
 TGCCACCTGA CGTC

(未発表)

図2. ヒトβ型インターフェロンcDNAを含むプラスミドの遺伝子構成成分



(未発表)



図4. ヒトβ型インターフェロンcDNAを含むプラスミドの作製手順

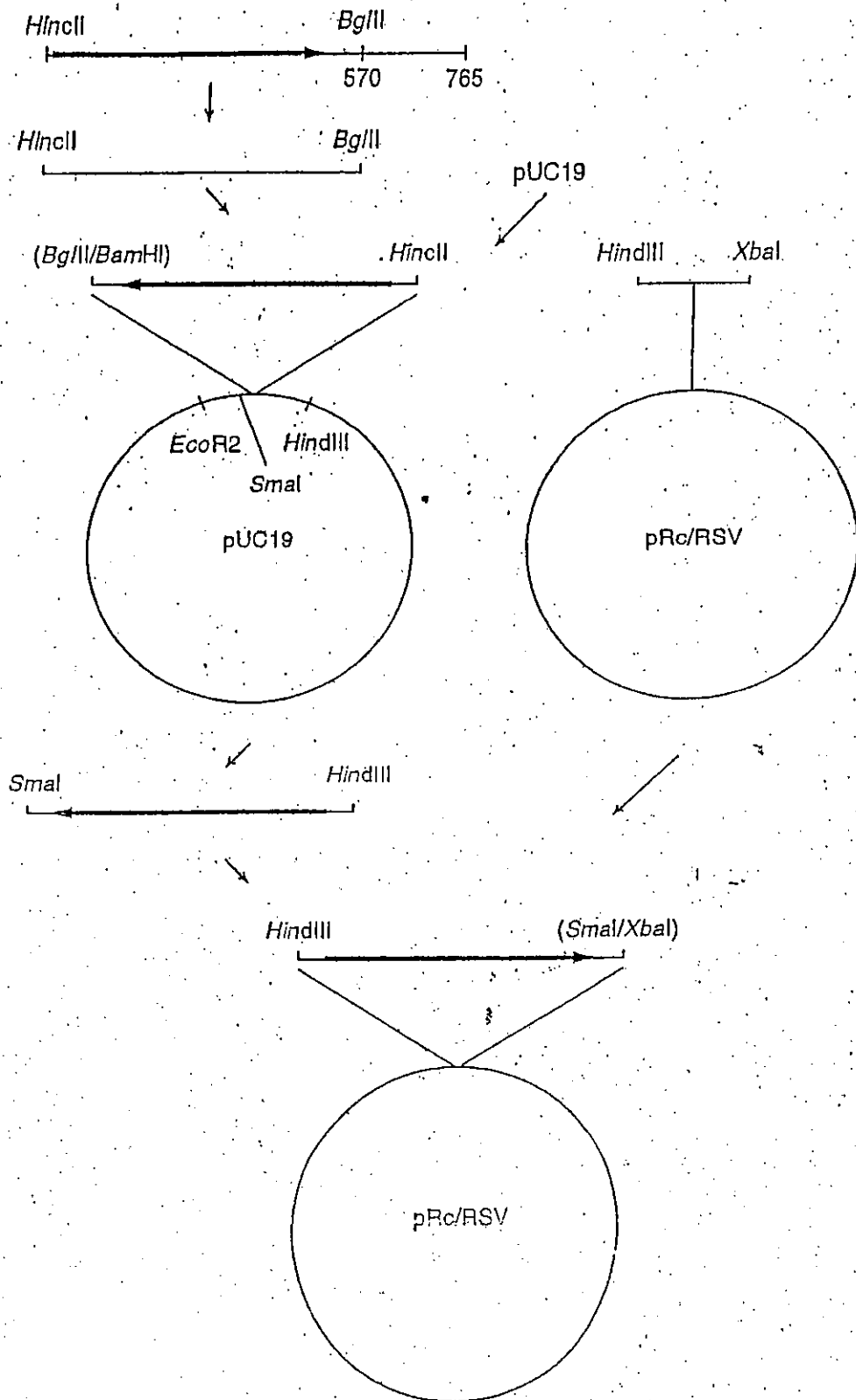


図5. ノードマウス移植ヒト悪性黒色腫へのヒト $\beta$ 型遺伝子包埋  
リポソーム局注の抗腫瘍効果 (一群6匹)

1回量3 $\mu$ gDNAを1回(S)および6回(M)隔日投与群で  
腫瘍結節の増殖が有意に抑制された。

