

バイオ技術を駆使したマグネタイト微粒子製剤を用いる  
がんの温熱免疫療法の開発

所属機関：中部大学応用生物学部

研究者名：小林 猛

## 《研究の概要》

磁性ナノ粒子を用いて悪性腫瘍部位だけを加熱する温熱療法を開発した。磁性ナノ粒子であるマグネタイト微粒子を悪性腫瘍部位だけに集積させ、交番磁界を照射すると磁性ナノ粒子だけが発熱する性質を利用した。加熱に伴って熱ショックタンパク質(HSP)が多量に生成し、これを介して、がん細胞特有の免疫活性が強く賦活される。

マグネタイト微粒子を悪性腫瘍部位だけに集積させるために、マグネタイトを発熱体とする二つの素材系を開発した。一つ目の素材は、悪性腫瘍細胞に対する特異性が高いモノクローナル抗体が開発されている場合に利用するものである。電荷を持たない組成のリポソームでマグネタイト微粒子を包埋し、リポソームの表面にモノクローナル抗体を共有結合させた素材(Antibody-conjugating magnetite liposome; AML)は静脈注射による投与が可能である。二つ目の素材として、カチオニックリポソームでマグネタイト微粒子を包埋することで、正電荷脂質包埋型マグネトリポソーム(Magnetite cationic liposome; MCL)を開発した。このMCLの場合には腫瘍組織に局注する必要がある。

温熱治療では多量のHSPが生成し、これを介して免疫賦活メカニズムが作動する。そこで、強力な免疫誘導材として知られているイミキモドの注射と温熱療法との併用効果も検討し、相乗効果があることが分かった。

AMLを使用した温熱治療の臨床研究を信州大学医学部皮膚科との共同研究により平成19年10月30日に実施した。また、腫瘍局所に注射するという制限はあるが、どのような固形腫瘍にも適用できる長所があるMCLを用いた温熱治療を名古屋大学医学部附属病院の乳腺・内分泌外科、耳鼻咽喉科、口腔外科および整形外科の4つの診療科合同の臨床応用を平成21年11月11日に開始した。

これまでは装置として交番磁界照射装置の利用を前提としてきた。この装置を使用する場合には、磁性微粒子のみが発熱し、正常部位は全く発熱しない、という特徴があるが、交番磁界が身体の深部にまで到達し難い性質のために、体表面から5cmより深い悪性腫瘍には適用が出来ない。現在臨床的に温熱療法で使用されているサーモトロンRF-8の場合には、8MHzの交流電流を腫瘍部位に流す方式であり、電極で挟んだ部位全体が加熱され、悪性腫瘍だけでなく、正常部位も加熱される、という欠点がある。我々はマグネタイト微粒子が存在する部位はサーモトロンRF-8を使用しても3-4℃程度高くなることを見いだした。そこで、サーモトロンRF-8が設置されており、日本での温熱治療の第一の実績がある戸畑共立病院がん治療センターでのMCLを用いた臨床応用を平成22年2月8日に開始した。現在、もっと多くの治療機関で実施できるように推進している。

共同研究者

堤内 要 中部大学応用生物学部准教授

糖鎖結合型マグネトリポソームの研究

斎田利明 信州大学医学部教授

メラノーマ患者の臨床研究

今井常夫 名古屋大学医学部附属病院講師

表在性腫瘍の臨床研究

今田 肇 戸畑共立病院がん治療センター長

表在性腫瘍の臨床研究

## 研究報告

### I 研究目的

これまでがんの治療は、手術、化学療法（抗がん剤）、放射線療法が主な治療法である。そして、多くの研究者が様々な観点から検討してきた。我々は逆にほとんど注目を集めてこなかった温熱療法の抜本的な改良研究をしよう、と考えた。

そこで、現在利用されている温熱療法とは違う原理に基づいて、悪性腫瘍部位だけを加熱できる方法を検討した。最後に到達した考えは、バイオ技術を駆使して悪性腫瘍にだけ磁性ナノ粒子を送り込み、交番磁界を照射して悪性腫瘍だけを加熱しよう、という戦略である。

がん細胞は細胞分裂を盛んに繰り返しており、通常の組織より悪性腫瘍組織の方が酸素をより多く必要としている。しかし、悪性腫瘍組織では新しく血管がまだ張り巡らされていないので、溶存酸素濃度は低くなり、pH も低い状態となっている。このため、正常組織よりは悪性腫瘍組織の方が温度上昇に対して細胞が死滅しやすくなっている。

現在行われている温熱療法は、悪性腫瘍が存在する身体の部位を電極で挟み、ラジオ波と同じ程度の周波数（8 MHz）の交流電流を流す方法である。この方法では主としてジュール熱損で加熱され、悪性腫瘍のみならず、電極で挟んだ正常組織も同時に温度が上がる。正常組織よりは悪性腫瘍組織の方が温度上昇に対して細胞が死滅しやすいが、患者さんの負担を考慮して、42℃を越す加熱は容易でなく、悪性腫瘍組織を温熱療法だけで退縮させることは難しい。

我々が開発した温熱療法は、磁性ナノ粒子であるマグネタイト微粒子を悪性腫瘍部位にだけに集積させ、交番磁界を照射すると磁性ナノ粒子だけが発熱する性質を利用する。悪性腫瘍部位を 46℃程度に保つとその周辺の細胞は確実に死滅する。全く新しい概念に基づいた温熱療法であり、加熱に伴って HSP が多量に生成し、これを介して、がん細胞特有の免疫活性が強く賦活される、という特徴がある。

### II 研究計画、材料と方法

磁性材料は交番磁界の照射によって発熱する。この発熱はヒステリシス損および Neel 緩和損という原理によるものである。したがって、磁性材料である金属片を悪性腫瘍組織だ

けに差し込んで交番磁界を照射すれば、その部位のみが加温される。金属片の温度が上がり、磁性が無くなる温度をキュリー温度といますが、キュリー温度が 60℃程度の合金素材を悪性腫瘍組織に差し込んでやれば、それ以上の温度には上昇しませんから、安全性は高まります。しかし、この方法には欠点もあります。金属片の周囲の温度は確かに上がりますが、悪性腫瘍組織の温度を全体的に上げることは出来ません。さらに、どこかの時点で挿入した金属片を取り除くための手術が必要となります。

これらの欠点を解消するために、ナノサイズの磁性微粒子、特に毒性が無いと考えられるマグネタイト（酸化鉄の  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ）微粒子を悪性腫瘍組織にだけ集積させる技術を開発しました。100 kHz 程度の交番磁界を照射しますと、水分子や鉄原子を含んでいるヘモグロビンはほとんど発熱せず、磁性体であるマグネタイト微粒子だけが発熱するので、正常組織は加温されずに、悪性腫瘍組織だけを何度にも加温できるわけです。マグネタイト微粒子は腫瘍部位に留まり、徐々に消失しますから、マグネタイト微粒子を取り除くための手術は不要です。なお、マグネタイト微粒子は肝臓がんの造影剤として臨床で既に使用されており、毒性はほとんど無い素材です。

マグネタイト微粒子を悪性腫瘍部位にだけに集積させるために、マグネタイトを発熱体とする二つの素材系を開発した。一つ目の素材としては、悪性腫瘍細胞に対する特異性が高いモノクローナル抗体が開発されている場合に利用するものである。電荷を持たない組成のリポソームでマグネタイト微粒子を包埋し、リポソームの表面にモノクローナル抗体を共有結合で固定化する。この素材(Antibody-conjugating magnetite liposome; AML)は静脈注射による投与が可能である。二つ目の素材として、カチオニックリポソームでマグネタイト微粒子を包埋することで、正電荷脂質包埋型マグネトリポソーム (Magnetite cationic liposome; MCL) を開発した。この MCL の場合には腫瘍組織に局注する必要がある。通常は、細胞は負に帯電しているから、腫瘍組織に注射することによって静電的な相互作用によって約 6 割が腫瘍組織に留まる。

開発した方法で腫瘍組織を焼き切ることも可能ですが、これはあまり利口な方法ではありません。悪性腫瘍組織を 44℃ ~ 46℃程度に 30 分間保つのが重要な点であり、このことによって、加温をしたときに生成するタンパク質である熱ショックタンパク質 (heat shock proteins ; HSP) が多量に生成します。この HSP が腫瘍抗原ペプチドと結合し、免疫に関連した細胞障害性 T 細胞および NK 細胞を腫瘍特異的に活性化することを見いだしました。このことは腫瘍細胞をラットの両体側に移植する動物実験で実証しました。両体側の T-9 ラットグリオーマ皮下腫瘍のうち、左側の腫瘍にだけ MCL を注入して交番磁界を照射したところ、MCL に含まれるマグネタイト微粒子は交番磁場によって発熱し、MCL を注入した左側の腫瘍は 44℃まで温度が上昇しました。一方、MCL が注入されていない右側の腫瘍や直腸は温度がほとんど上昇しませんでした。しかし、このモデルで、マグネタイト微粒子を用いた温熱療法を施行した 28 日後、温度上昇があった左側の腫瘍だけでなく、直接的な温度上昇が観察されなかった右側の腫瘍まで、完全に退縮しました。また、温熱療法後

の腫瘍組織内に CD8 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、およびナチュラルキラー (NK) 細胞が集積している様子が観察されました。さらに、脾細胞を用いた免疫細胞による細胞障害活性測定を行ったところ、T-9 細胞に特異的な全身性の抗腫瘍免疫が活性化していることがわかりました。このような **Remote effect** が観察されたことは大変好ましいことです。本治療法は、腫瘍局所における選択的な温熱療法であるにもかかわらず、直接加温されない全身のがん（転移がんを含む）に対しても免疫賦活によって治療効果を示すといった、がん治療の理想を実現可能にする治療法であると考えられます。

この免疫賦活メカニズムを解明することは、我々が開発した温熱療法の従来のがん治療法に対する優位性を示すことができるだけでなく、そのメカニズムを応用した新しい観点のがん治療法の開発につながります。そこで、マグネタイト微粒子を用いた温熱療法における免疫賦活のメカニズムについて、いかにしてがん細胞が抗原として免疫細胞に認識されるかを HSP に着目して研究を行いました。

HSP は熱ショックタンパク質という名が示す通り、熱をはじめとするストレスで細胞内発現が誘導されるタンパク質です。HSP70、HSP90 および gp (glucose-regulated protein) 96 といった HSP が、がん免疫において重要な役割を果たしていることが Srivastava らによって示されました (*Immunity*, 8, 657-665 (1998))。それによれば、(1)免疫プロテアソーム複合体によって切り出されたペプチドは、細胞質内で HSP70 あるいは HSP90 にシャペロンされます。これらの HSP は抗原ペプチドを TAP (transporters associated with antigen processing) を介して小胞体内に運搬します。(2) 小胞体内で抗原ペプチドは gp96 にシャペロンされます。そして、(3) gp96 は抗原ペプチドを MHC class I/ $\beta_2$  ミクログロブリン複合体へ輸送します。このことから、腫瘍免疫における HSP の二つの重要な意義を見出すことができます。一つ目は、HSP が腫瘍細胞表面における MHC class I 分子の抗原提示を促進させる役割を果たすという点です。HSP70 を高発現させることで、がん細胞自身が MHC class I を介した抗原提示を活発に行い、がん細胞が免疫担当細胞（特にがん細胞特異的な CD8 陽性 T 細胞）に攻撃されやすくなったと考えることができます。もう一つの重要な知見は、HSP ががん細胞内で腫瘍抗原ペプチドをシャペロンしているという点です。

温熱療法において 46°C 程度に加温すると、HSP 発現が増強し、さらにはがん細胞が熱で壊死（ネクローシス）を起こすことによって、細胞内から HSP-抗原ペプチド複合体が放出されます。放出された HSP-抗原ペプチド複合体は樹状細胞等の専門的抗原提示細胞 (Antigen presenting cell, APC) の CD91 レセプター等の特異的レセプターと結合し、HSP-抗原ペプチド複合体はエンドサイトーシスによって取り込まれ、APC 内の MHC class I 提示経路のプロセッシングを受けて、抗原ペプチドは MHC class I によって細胞表面に提示されることとなります。

我々が開発した温熱療法に伴う免疫賦活のメカニズムについてまとめると、1) ガン細胞は一般的に免疫原性が低い。細胞内では HSP 発現が低く、抗原のプロセッシング機能が低下

しており、細胞表面の MHC class I 分子も減少している。2) マグネタイト微粒子による温熱療法によって、壊死に至らないガン細胞においては、細胞内の HSP 発現誘導が起こり、細胞表面の MHC class I 密度が増強する。これらのガン細胞は腫瘍特異的な T 細胞によって攻撃される。3) T 細胞、あるいは温熱療法によって殺されたガン細胞の細胞内から HSP-抗原ペプチド複合体が放出される。4) 放出された HSP は単球細胞の炎症性サイトカイン産生を刺激し、APC を腫瘍内へ集積させる。5) HSP-抗原ペプチド複合体が DC 等の APC に取り込まれ、MHC class I を介して腫瘍特異的な T 細胞に提示される、ということとなります。

HSP を介した免疫賦活メカニズムを基にして、さらに温熱免疫療法の免疫賦活能を高めるための新しい治療方法の開発も研究しました。具体的には、マグネタイト微粒子を用いた温熱療法との組み合わせとして、IL-2 などのサイトカインとの併用療法、樹状細胞との併用療法、などの開発を行いました。マグネタイト微粒子を用いた温熱療法だけでも十分悪性腫瘍を退縮させることが可能ですが、これらの組み合わせ方法も実際の治療法として役立つものと考えられます。このことをさらに補強するために、以下の実験を行いました。

イミキモドは自然免疫に関連した TLR 7 (Toll-like receptor 7) を介してヘルパー T 細胞 1 を増殖させ、これがインターロイキン(IL)-12 を分泌生産させ、NK 細胞や細胞障害性 T 細胞が活性化して、強力な免疫誘導が惹起される。しかもイミキモドは臨床でも既に使用されている。そこで、イミキモドの注射と温熱療法との併用効果を検討しました。

### Ⅲ 研究成果

#### Ⅲ-1 AML を使用した腎細胞がんの温熱療法

ヒト腎細胞がんの 9 割に MN 抗原が細胞膜に提示されている。この MN 抗原に対する遺伝子が取得されているので、遺伝子組換え技術により、MN 抗原を細胞膜に提示させたマウスの腎細胞がんを作成した。この細胞をマウスの片方の腎臓に注射すれば、10 日後にはマウスの腎細胞がんモデルができる。

また、MN 抗原に対するモノクローナル抗体を作り、この抗体を結合させた AML を調製した。この AML を血中投与すると、悪性腫瘍部位だけにマグネタイトが集積(投与量の約 6 割)していた。AML は直径約 100 nm の大きさであり、血中投与によっても悪性腫瘍組織への集積性が認められた。このようなマウスの腎細胞がんモデルにおいて温熱治療は効果が認められた。

#### Ⅲ-2 強力な腫瘍免疫が誘導されるようにするイミキモド投与との併用効果

マウスに代表的な悪性腫瘍であるメラノーマ細胞 B16 を注射した動物モデルを使用した。46°C に 30 分間の温熱治療を 1 回実施するという条件とした。複数回の温熱治療を行えば腫瘍は退縮するが、イミキモド投与との併用療法の効果を検討するのが主目的のために、1 回の温熱治療では効果が少ない条件とした。温熱治療を実施して 25 日後に、腫瘍体積は無

治療群では 25,000mm<sup>3</sup>、イミキモドのみの投与群では 5,000 mm<sup>3</sup>、温熱治療のみの群では 7,200 mm<sup>3</sup>であったが、イミキモドの投与と温熱治療の併用群では 880 mm<sup>3</sup>であった。イミキモドは臨床でも既に使用されているので、このような腫瘍免疫を誘導する薬と温熱治療との併用は臨床でももっと積極的に応用すべきであることが明らかになった。

### III-3 AML を用いる進行期メラノーマの温熱治療

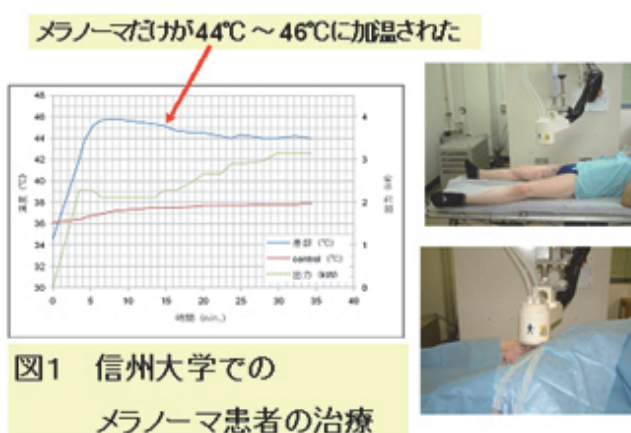
メラノーマは皮膚転移を生じることが多く、とくに日本人では四肢末端部が好発部位であり、しばしば原発巣と所属リンパ節の間に皮膚・皮下転移を多発する。これらの表在性の多発性転移巣に対する効果的かつ侵襲の少ない新しい治療法の開発が強く望まれている。

メラノーマに対しては多くの抗原が明らかになっている。米国 Roswell Park Cancer Institute 免疫学部門主任の Ferrone 教授は高分子量メラノーマ関連抗原に対する抗体を開発し、臨床研究もしてきたので、彼から供与される抗体 (225.28) を使用することとした。この抗体を結合させた AML を中部大学で GMP 基準に準拠して調製した。

最初に動物モデルで AML を用いる進行期メラノーマの温熱治療が有効なことを確認した。高分子量メラノーマ関連抗原陽性の 3 種類のヒトメラノーマ細胞株 MV3、RPM-EP、MM-AN を移植したヌードマウスの実験系を用いて AML の腫瘍内投与と交番磁界照射による局所温熱療法を行い、その治療効果を確認した。また、AML の投与量や注入方法、交番磁界照射による局所温度上昇など、第一相臨床試験の治療プロトコル策定に必要なデータを得た。さらに、MV3 移植ヌードマウスを用いて AML の腫瘍内投与後の臓器分布に関する検討を行い、AML は投与 48 時間後にも腫瘍内に貯留していること、肝臓、脾臓、肺における AML の沈着が、対照とした場合と比較して有意に少ないことを確認した。

これらの成績を基に AML 局注後 30 分後、24 時間後、48 時間後の 3 回それぞれ 30 分間交番磁界を照射し、腫瘍表面温度を 46°C に加熱するという臨床試験のための最終的条件を決定し、この照射条件によりヒトメラノーマ細胞移植ヌードマウスの腫瘍を完全退縮に導けることを確認した。外部委託による AML の安全性試験と薬物動態学的試験を完了した。さらに、AML の GMP 準拠基準における製剤化と院内製剤化手順の作成、臨床試験関連文書 (臨床試験プロトコル、AML 製剤概要書、交番磁界照射装置概要書、説明同意文書、症例報告書、有害事象対応マニュアル

この照射条件によりヒトメラノーマ細胞移植ヌードマウスの腫瘍を完全退縮に導けることを確認した。外部委託による AML の安全性試験と薬物動態学的試験を完了した。さらに、AML の GMP 準拠基準における製剤化と院内製剤化手順の作成、臨床試験関連文書 (臨床試験プロトコル、AML 製剤概要書、交番磁界照射装置概要書、説明同意文書、症例報告書、有害事象対応マニュアル



など)の作成、臨床用交番磁界照射装置の設置を行った。

信州大学医学部皮膚科齋田俊明教授の研究グループは平成19年1月末に進行期メラノーマを対象としたAMLの転移腫瘍内投与による局所温熱免疫療法の第1相+早期第II相臨床試験を信州大学医学部医倫理委員会先端医療専門小委員会に申請した。同年8月に倫理委員会の承認が得られ、平成19年10月30日に初めての臨床試験が行われた(図1)。AMLは静注可能であるが、治療するメラノーマが皮膚表面にあるので、その部位にAMLを局注した。交番磁界を照射するとメラノーマの温度は順調に加温され、44℃から46℃に保たれた。なお、平成21年度末までに合計3例の臨床試験が実施された。

#### III-4 名古屋大学医学部附属病院との共同研究

これまでAMLを用いた温熱療法の研究も行いましたが、抗体が無くても使用できる簡便さから、主としてMCLを用いた研究をこれまで行ってきました。現在までに様々な動物種(マウス、ラット、ハムスター、ウサギ)やガン種(脳腫瘍、皮膚ガン、舌ガン、乳ガン、腎細胞ガン、骨肉腫)で腫瘍の退縮に成功しています。研究者としての立場からはAMLは魅力的な素材であるが、臨床家としての立場からはMCLに魅力を感じる、と多くの外科医から指摘を受けて、MCLを使用した温熱療法の臨床試験を名古屋大学医学部附属病院の乳腺・内分泌外科、耳鼻咽喉科、口腔外科および整形外科の4つの診療科合同の主として表在性の悪性腫瘍を対象とした臨床研究を開始した。

信州大学と同様に、外部委託によるMCLの安全性試験と薬物動態学的試験を完了した。さらに、MCLのGMP準拠基準における製剤化と院内製剤化手順の作成、臨床試験関連文書(臨床試験プロトコル、製剤概要書、交番磁界照射装置概要書、説明同意文書、症例報告書、有害事象対応マニュアルなど)の作成、臨床用交番磁界照射装置の設置を行った。平成20年8月末に表在性の悪性腫瘍を対象としたMCLの腫瘍内投与による局所温熱免疫療法の第I相臨床試験を名古屋大学医学部倫理委員会(バイオ先端臨床研究審査委員会)に申請した。平成21年8月に倫理委員会の承認が得られ、平成21年11月11日に初めての臨床試験が実施された(図2)。甲状腺癌の転移部位に対してMCLが局注された。マグネタイト微粒子が転移部位に留まっていることをX線CTで確認した後で、交番磁界が患部に照射された。患部の温度は順調に加温され、出力電圧を調整して44℃から46℃に保たれた。なお、平成21年度末までに合計2



図2 名古屋大学での臨床研究



例の臨床試験が実施された。

### Ⅲ－５ 戸畑共立病院がん治療センターとの共同研究

これまでは装置として交番磁界照射装置の利用を前提としてきた。この装置を使用する場合には、磁性微粒子のみが発熱し、正常部位は全く発熱しない、という特徴があるからである。しかし、現在の交番磁界照射装置では、交番磁界が身体の深部にまで到達し難いという性質のために、体表面から 5 cm より深い悪性腫瘍には適用が出来ない。これに対して、現在臨床的に温熱療法で使用されているサーモトロン RF-8 の場合には、8 MHz の交流電流を腫瘍部位に流す方式である。この場合には電極で挟んだ部位全体が加温され、悪性腫瘍だけでなく、正常部位も加温される、という欠点がある。患者の正常部位も温熱治療でダメージを受けないように 42℃までの加温しか実施出来ず、大きな治療効果が期待できない。しかし、深部腫瘍にも適用されており、多くの病院に設置されている。我々はマグネタイト微粒子が存在する部位はサーモトロン RF-8 を使用しても 3-4℃程度高くなることを見いだした。この原理を利用すれば、現在の温熱療法の問題点、つまり腫瘍部位を 43℃以上に加温し、熱により壊死させることが可能となる。そこで、サーモトロン RF-8 が設置されており、日本での温熱治療の第一の実績がある戸畑共立病院がん治療センターでの臨床研究を開始した。

名古屋大学と同様にして、MCL に関する安全性や臨床試験関連文書などの書類を同病院の倫理委員会に提出した。この場合、装置としては臨床で既に使用されているサーモトロン RF-8 を利用するので、装置に関する書類は不要である。倫理委員会の承認のもとで、患者さんに対する温熱療法が平成 22 年 2 月 8 日に実施された (図 3)。直径 7 cm もの巨大な頭頸部腫瘍がある患者さんに、最初は通常の温熱療法が同年 2 月 2 日に実施された。電力として 226 kW が流されたが、腫瘍部位は 42℃までしか加温出来なかった。これに対して、MCL を腫瘍部位に局注した後で同年 2 月 8 日に実施された温熱療法では、電力として 188 kW が流された段階で腫瘍部位は 44℃に達した。この温度は細胞を熱で死滅させるのに十分な温度であり、安全性を重視してここまでの加温に留めた。もっと電力を上げることは可能であるから、将来的には腫瘍部位を 46℃まで加温することが可能とな

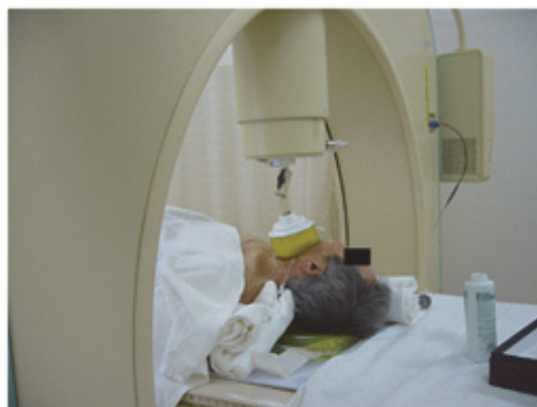


図3 MCLとサーモトロンRF-8 による温熱治療

ろう。

#### IV 考察

悪性腫瘍に対する薬剤を使用し続けると、やがてその薬剤に抵抗性の悪性腫瘍細胞が出現してきて、その薬剤は使用できなくなる。しかし、熱という物理的な因子に対しては温度に対する抵抗性の悪性腫瘍細胞は出現しないので、原理的には全ての固形腫瘍に応用できる方法である。

MCL を構成する素材であるマグネタイトは、肝臓ガンの MRI 造影剤としてすでに医療の現場で使用されている。マウスを用いた予備的な検討であるが、一回の投与量である 3mg のマグネタイトは 10 日間で完全に排泄され、45 倍のマグネタイト投与量に対する急性毒性は認められなかった。腫瘍を熱で殺す、という簡単な原理に基づいているので、原理的には全ての固形腫瘍に適用できる方法であり、少しでも早期に実用化することを検討している。また、サーモトロン RF-8 は多くの病院に設置されているので、MCL を用いた温熱療法が他の多くの病院で実施され、がんの治療に役立つように支援したい。

最後に、本研究事業にご支援を賜りました、財団法人車両競技公益資金記念財団に深く感謝申し上げます。

#### V 研究成果の発表

- 1) Hiro Takahashi, Yasuyuki Murase Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda : New cancer diagnosis modeling using boosting and projective adaptive resonance theory with improved reliable index, *Biochemical Engineering Journal*, 33, 100-109 (2007)
- 2) Mina Okochi, Izumi Nakagawa, Takeshi Kobayashi, Shuhei Hayashi, Shintoro Furusaki, Hiroyuki Honda : Enhanced activity of 3 $\delta$ -hydroxysteroid dehydrogenase by addition of the co-solvent 1-butyl-3-methylimidazolium (L)-lactate in aqueous phase of biphasic systems for reduction of steroids, *Journal of Biotechnology*, 128, 376-382 (2007)
- 3) Akira Ito, Takeshi Kobayashi, Hiroyuki Honda : Heat immunotherapy with heat shock protein expression by hyperthermia using magnetite nanoparticles, *Ann. Cancer Res. Therap.*, 15(2), 27-34 (2007)
- 4) H. Takahashi, H. Iwakawa, S. Nakao, T. Ojio, R. Morishita, S. Morikawa, Y. Machida, C. Machida, T. Kobayashi : Knowledge-based fuzzy adaptive resonance theory and its application to the analysis of gene expression, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(6), 587-593, (2008)
- 5) Akira Ito, Takeshi Kobayashi : Intracellular hyperthermia using magnetic nanoparticles: A novel method for hyperthermia clinical applications, *Thermal Medicine*, 24, 113-129 (2008)
- 6) Jun Motoyama, Noriyuki Yamashita, Tomio Morino, Takeshi Kobayashi, Hiroyuki Honda : Hyperthermic treatment of DMBA-induced rat mammary cancer using magnetic nanoparticles, *BioMagnetic Research and Technology*, 6, 2 (2008) doi: 10.1186/1477-044X-6-2

- 7) Jun Motoyama, Toshiyuki Hakata, Ryuji Kato, Noriyuki Yamashita, Tomio Morino, Takeshi Kobayashi, Hiroyuki Honda : Size dependent heat generation of magnetite nanoparticles under AC magnetic field for cancer therapy, *BioMagnetic Research and Technology*, 6, 4 (2008) doi: 10.1186/1477-044X-6-4
- 8) Toyone Kikumori, Takeshi Kobayashi, Makoto Sawaki and Tsuneo Imai : Anti-cancer effect of hyperthermia on breast cancer by magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes, *Breast Cancer Research Treatment*, 113, 435-441 (2009)
- 9) Y. Shido, Y. Nishida, Y. Suzuki, T. Kobayashi, N. Ishiguro : Targeted hyperthermia using magnetite cationic liposomes and an alternating magnetic field in a mouse osteosarcoma model, *Journal of Bone and Joint Surgery*, 92-B, 580-585 (2009)