

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5403844号
(P5403844)

(45) 発行日 平成26年1月29日 (2014. 1. 29)

(24) 登録日 平成25年11月8日 (2013. 11. 8)

(51) Int. Cl.

F 1

C O 7 D 207/444 (2006. 01)
A 6 1 K 31/341 (2006. 01)
A 6 1 K 31/4015 (2006. 01)
A 6 1 K 36/07 (2006. 01)
A 6 1 P 1/16 (2006. 01)

C O 7 D 207/444
A 6 1 K 31/341
A 6 1 K 31/4015
A 6 1 K 35/84 A
A 6 1 P 1/16

請求項の数 3 外国語出願 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-58125 (P2004-58125)
(22) 出願日 平成16年3月2日 (2004. 3. 2)
(65) 公開番号 特開2005-247724 (P2005-247724A)
(43) 公開日 平成17年9月15日 (2005. 9. 15)
審査請求日 平成18年1月16日 (2006. 1. 16)
審判番号 不服2010-19934 (P2010-19934/J1)
審判請求日 平成22年9月3日 (2010. 9. 3)

(73) 特許権者 503144386
善笙生物科技股▲分▼有限公司
台湾桃園縣 3 3 3 龜山郷文明二街 1 之 1 號
(74) 代理人 100108453
弁理士 村山 靖彦
(74) 代理人 100064908
弁理士 志賀 正武
(74) 代理人 100089037
弁理士 渡邊 隆
(74) 代理人 100110364
弁理士 実広 信哉
(72) 発明者 服部 征雄
富山県杉谷 2 6 3 0 番地

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 *Antrodia Camphorata* の菌糸体から得た新規な混合物及び化合物、並びにその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の化合物：

3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]フラン-2,5-ジオン；
3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]-1H-ピロール-2,5-ジオン；
3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]-1H-ピロール-1-オール-2,5-ジオン；

3R⁺, 4S⁺-1-ヒドロキシ-3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]ピロ
リジン-2,5-ジオン；または

3R⁺, 4R⁺-1-ヒドロキシ-3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]ピロ
リジン-2,5-ジオン；

を含む、*Antrodia camphorata* (サルノコシカケ科、平はら茸目) の菌糸体のエタノール抽出物を有効成分として含む、収縮期の血圧減少のための医薬組成物。

【請求項 2】

以下の化合物：

3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]フラン-2,5-ジオン；
3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]-1H-ピロール-2,5-ジオン；
3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]-1H-ピロール-1-オール-2,5-ジオン；

3R⁺, 4S⁺-1-ヒドロキシ-3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]ピロ

10

20

リジン-2,5-ジオン；または

3R⁺,4R⁺-1-ヒドロキシ-3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]ピロ
リジン-2,5-ジオン；

を含む、Antrodia camphorata(サルノコシカケ科、平はら茸目)の菌糸体のエタノール抽出物を有効成分として含む、高密度リボプロテイン増大のための医薬組成物。

【請求項3】

以下の化合物：

3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]フラン-2,5-ジオン；

3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]-1H-ピロール-2,5-ジオン；

3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]-1H-ピロール-1-オール-2,5-
ジオン；

3R⁺,4S⁺-1-ヒドロキシ-3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]ピロ
リジン-2,5-ジオン；または

3R⁺,4R⁺-1-ヒドロキシ-3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]ピロ
リジン-2,5-ジオン；

を含む、Antrodia camphorata(サルノコシカケ科、平はら茸目)の菌糸体のエタノール抽出物を有効成分として含む、抗炎症のための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、*Antrodia Camphorata*の菌糸体から得た新規な混合物及び化合物、並びにその使用に関する。本発明は、本発明の化合物を含む組成物または菌糸体に関する。

【背景技術】

【0002】

Antrodia camphorata(サルノコシカケ科、平はら茸目)の子実体は、伝統的な漢方薬として台湾で周知である。それは台湾において、土地固有の常緑樹*Cinnamomum kanehirai*(干草)(クスノキ科)の内部心材壁にのみ生育する。それは稀であり、培養されていない。子実体は、食料及び薬剤中毒、下痢、腹痛、高血圧、肌のかゆみ、及び肝臓ガンの治療のために使用されている。非常に少数の生物学的活性の研究が、これまで報告されている。

【0003】

台湾において"niu-chang-chih"または"niu-chang-ku"としても知られている*Antrodia camphorata*は、子実体に存在している担子胞子の円筒形状、弱いアミロイド骨格菌糸、苦味、及び傘のある担子胞子に逆さまの軽い桂皮、並びに純粋培養における厚膜胞子及びアントロコニディア(*anthroconidia*)によって特徴付けられる、新規な真菌種として最近報告された。この新規な真菌種の成育は極端に遅く、唯一の宿主として、土地固有の樹木種である*Cinnamomum kanehirai* Hay(クスノキ科)に制限される。*Antrodia camphorata*の詳細な特徴及び分類学上の位置は、Wu, S.-H,等, *Antrodia cinnamomea* ("niu-chang-chih"), *New combination of a medicinal fungus in Taiwan*, Bot. Bull. Acad. Sin. 38: 273-275 (1997)に記載された。

【0004】

台湾の民間療法では、*Antrodia camphorata*の子実体は、ある医薬効果を有すると信じられている。伝統的な方法によると、子実体をドライパウダーに砕き、または経口摂取のための他の薬草と共に煮て、中毒、下痢、腹痛、高血圧、皮膚のかゆみ、及び肝臓ガンによって生じる疾患を治療する。しかしながら、これらの観点における薬理的または臨床的研究は、今日まで文献にほとんど現れていない。その厳密な宿主特異性と、天然での希少性、並びに人工培養の失敗のため、"niu-chang-chih"は、台湾で非常に効果である。近年、高純度のこの真菌の子実体は、kg当たり約15,000米ドルという非常に高価格で販売されている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 5 】

本発明の目的は、Antrodia Camphorataの菌糸体から新規な混合物を提供することである。

【 0 0 0 6 】

本発明の別の目的は、Antrodia Camphorataの菌糸体から新規な化合物を提供することである。

【 0 0 0 7 】

本発明の更なる目的は、本発明の化合物を含む新規な組成物を提供することである。

【 0 0 0 8 】

本発明の更なる目的は、本発明の化合物を含むAntrodia Camphorataの新規な菌糸体を提供することである。

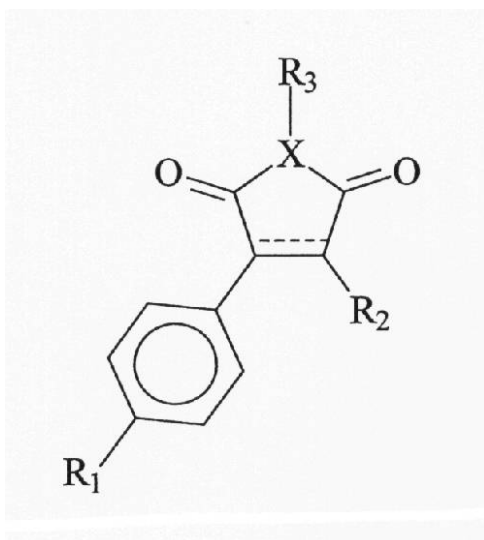
10

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 9 】

本発明は、下式を有する化合物を提供する：

【化 1】



20

[式中、

30

XはNまたはOであり；

R₁はC₁₋₁₀アルキルオキシ、C₂₋₁₀アルケニルオキシ、またはC₂₋₁₀アルキニルオキシであり；

R₂はH、C₁₋₁₀アルキル、C₂₋₁₀アルケニル、またはC₂₋₁₀アルキニルであり；

R₃は不在であるか、H、またはヒドロキシであり；

ただしXがOである場合、R₃は不在である]。

【 0 0 1 0 】

本発明の化合物では、好ましいR₁は、C₂₋₆アルケニルオキシ、またはC₂₋₆アルキニルオキシである；より好ましいR₁は、C₁₋₆アルキルで置換されたC₂₋₆アルケニルオキシであり、もっとも好ましいR₁は、メチルで置換されたブテニルオキシである。本発明の化合物では、好ましいR₂はC₁₋₆アルキルであり、もっとも好ましいR₂はイソブチルである。

40

【 0 0 1 1 】

従って、本発明の好ましい化合物は、以下のものである：

3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]フラン-2,5-ジオン；

3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]-1H-ピロール-2,5-ジオン；

3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]-1H-ピロール-1-オール-2,5-ジオン；

3R⁺,4S⁻-1-ヒドロキシ-3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]ピロリジン-2,5-ジオン；または

3R⁺,4R⁻-1-ヒドロキシ-3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]ピロ

50

リジン-2,5-ジオン。

【 0 0 1 2 】

本発明の更に好ましい化合物は、3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、または3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]-1H-ピロール-1-オール-2,5-ジオンである。本発明の更に好ましい化合物は、3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]-1H-ピロール-1-オール-2,5-ジオンである。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 3 】

本発明はまた、本発明の化合物を含むAntrodia Camphorataの菌系体由来の混合物を提供する。本発明の混合物は、Antrodia Camphorataの菌系体の水または有機溶媒抽出物から調製される。有機溶媒は、アルコール (CH_3OH 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 、 $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$ のような)、エステル(アセチルアセタートのような)、アルカン(ヘキサンのような)、及びハロゲン化アルカン(CH_3Cl 、 $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_2$ のような)を含むがこれらに制限されない。好ましい有機溶媒は、ヒトにいずれの副作用も引き起こさないエタノールまたはアルコール性溶媒である。本発明の混合物は、収縮期の血圧を減少でき、または高密度リポプロテインを増大できる。更に同じ混合物は、中枢コリン作用性アゴニズム、肝臓予防、抗炎症性、または抗腫瘍性の活性を有する。特に本発明の混合物は、肝臓、腸、骨、血液、リンパ、及び乳房からなる群から選択される細胞または組織から腫瘍を阻害できる。本発明の混合物を受け取る対象は、ヒト、哺乳動物、マウス、ラット、ウマ、ブタ、ニワトリ、アヒル、イヌ、及びネコを含むがこれらに制限されない。

【 0 0 1 4 】

本発明はまた、本発明の化合物を含む組成物を提供する。本発明の組成物は、収縮期の血圧を減少でき、または高密度リポプロテインを増大できる。更に本発明の組成物は、中枢コリン作用性アゴニズム、肝臓予防、抗炎症性、または抗腫瘍性の活性を有する。特に本発明の組成物は、肝臓、腸、骨、血液、リンパ、及び乳房からなる群から選択される細胞または組織から腫瘍を阻害できる。本発明の組成物を受け取る対象は、ヒト、哺乳動物、マウス、ラット、ウマ、ブタ、ニワトリ、アヒル、イヌ、及びネコを含むがこれらに制限されない。

【 0 0 1 5 】

本発明はまた、本発明の化合物を含むAntrodiaの新規な菌系体を提供する。好ましい菌系体は、生の菌系体の少なくとも1重量%が本発明の化合物1-5である。もっとも好ましい菌系体は、生の菌系体の少なくとも3重量%が本発明の化合物1-5である。Antrodia Camphorataの菌系体は、T.L.M. Stamford等, Food Science "Protein enrichment of cashew wastes for animal feeds" (<http://unu.edu/unupress/food/8F101e/8F101E0b.htm>)のような浸液発酵によって以前に調製されている。

【実施例】

【 0 0 1 6 】

以下の実施例は比制限的であり、本発明の各種の態様及び特徴を単に表すものである。

【 0 0 1 7 】

一般的実験方法

Yanagimotoミクロホットステージ融点装置で融点測定し、矯正しなかった。Jasco DIP-360自動旋光計で旋光度を測定した。Shimadzu UV-2200レコーディング分光光度計でUVスペクトルを測定した。Jasco FT/IR-230赤外線スペクトロメーターでIRスペクトルを測定した。Varian Unity Plus 500スペクトロメーターで、 ^1H -及び ^{13}C -NMRスペクトルを測定した。Jeol JMS-AX505HADマスマスペクトロメーターで70eVのイオン化電圧で、EIMS及びHR-EIMSを測定した。シリカゲルBW-820MH(常相)及びChromatorex-ODS DM1020T(逆相)(Fuji Silysia)で、カラムクロマトグラフィーを実施した。

【 0 0 1 8 】

抽出と単離

Simpson Biotech Co. Ltd., Taiwan, 2001年10月から得た *Antrodia camphorata* 菌系体パウダー (ACM) (60g) を、還流下で3時間 CHCl_3 で三回抽出した。 CHCl_3 抽出物 (5.3g) を、*n*-ヘキサン-アセトン (19:1-14:6) 及び CHCl_3 -MeOH (1:1) での溶出でシリカゲルでクロマトグラフィーに掛け、9の分画 (Fr.1-9) を得た。分画2をシリカゲルでクロマトグラフィーに掛け、化合物1 (8.7mg) を得た。分画4を常相及び逆相シリカゲルでクロマトグラフィーに掛け、化合物2 (13.6mg) を得た。分画5を *n*-ヘキサン-アセトン (8:2) で溶出するシリカゲルでクロマトグラフィーに掛け、エルゴステロールパーオキシド (35.8mg) を得た。分画6は、常相及び逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーの組み合わせにより、化合物3 (14.6mg) を得た。分画7は、カラムクロマトグラフィーにより、化合物4及び5 (4:1) の混合物を生じた。その後化合物4及び5の混合物を予備のHPLC [カラム: Tosoh TSK-gel ODS-80YM (21.5 × 300nm)、移動相: 0.1% TFAを含む $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (70:30)] によって分離した。

【0019】

3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]フラン-2,5-ジオン (化合物1) :

黄色油 ; UV (MeOH) λ_{max} (log) 227 (4.1), 258 (3.9), 275 (3.8), 355 (3.4) nm; IR (CHCl_3) ν_{max} 1763 cm^{-1} ; ^1H -NMR 表1; ^{13}C -NMR 表2; EIMS m/z 314 [$\text{M}]^+$ (100), 246 (100), 131 (100); HR-EIMS m/z 314.1523 ($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_4$ についての計算値, 314.1518)。

3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]-1H-ピロール-2,5-ジオン (2) :

黄色針状結晶 (*n*-ヘキサン-AcOEt); mp 110-111 ; UV (MeOH) λ_{max} (log) 230 (4.3), 272 (3.5), 355 (3.7) nm; IR (CHCl_3) ν_{max} 1724 cm^{-1} ; ^1H -NMR 表1; ^{13}C -NMR 表2; EIMS m/z 313 [$\text{M}]^+$ (8), 245 (100), 203 (77), 131 (28); HR-EIMS m/z 313.1681 ($\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ についての計算値, 313.1678)。

【0020】

化合物2のX線結晶解析 :

黄色の針状結晶を、*n*-ヘキサン-AcOEt からの結晶化によって得て、データ回収のために選択した。結晶データ: $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_3$; M_r = 313.40; 寸法 0.15 × 0.02 × 0.02 mm; 三斜晶系、空間基 $P1$ (#2), a = 6.3505 (5), b = 12.205 (1), c = 12.560 (2), β = 64.623 (7)°, γ = 75.358 (4)°, δ = 84.681 (5)°, V = 850.9 (2) Å³, Z = 2, D_{calc} = 1.223 g/cm³, μ (MoK α) = 0.82 cm⁻¹, $F(000)$ = 336.00。93Kでグラフィートモノクロマト化Mo-K (λ = 0.71069 Å) 放射線を使用する Rigaku RAXIS-RAPID Imaging Plate 自動回折計で測定を実施した。回収された8950の反射の中で、4745はユニークであった (R_{int} = 0.108); 同等な反射を合わせた。結晶構造を直接法 (SHEL X S86) によって溶かし、フルマトリックスリーストスクエアによって精製した。非水素結合を異方性で精製した。水素原子を含むがこれに制限されなかった。最終指数は R = 0.074, R_w = 0.099, 並びに GOF (Guest Observer Facility) = 1.06 であった。最終差異 Fourier マップの最大及び最小ピークは、0.83 及び -0.89 e⁻/Å³ にそれぞれ対応した。

【0021】

3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]-1H-ピロール-1-オール-2,5-ジオン (化合物3) :

黄色油 ; UV (MeOH) λ_{max} (log) 232.5 (4.3), 296 (3.7), 374 (3.7) nm; IR (CHCl_3) ν_{max} 1717 cm^{-1} ; ^1H -NMR 表1; ^{13}C -NMR 表2; EIMS m/z 329 [$\text{M}]^+$ (12), 261 (100), 131 (50); HR-EIMS m/z 329.1637 ($\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ についての計算値, 329.1627)。

3R⁺, 4S⁺-1-ヒドロキシ-3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]ピロリジン-2,5-ジオン (4) :

無色油; [α]_D²³ +2.5° (c 0.2, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log) : 225 (4.3), 275 (3.3), 183 (3.2) nm; IR (CHCl_3) ν_{max} 1715 cm^{-1} ; ^1H -NMR 表1; ^{13}C -NMR 表2; EIMS m/z 331 [$\text{M}]^+$ (2), 263 (67), 207 (66), 191 (30), 179 (40), 133 (64), 69 (100); HR-EIMS m/z 331.1747 ($\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ についての計算値, 331.1783)。

3R⁺, 4R⁺-1-ヒドロキシ-3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]ピロリジン-2,5-ジオン (5) :

無色油; [α]_D²³ +3.0° (c 0.2, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log) : 227 (4.3), 275 (3.4), 283 (3.3) nm

10

20

30

40

50

m; IR(CHCl₃) V_{\max} 1715cm⁻¹; ¹H-NMR表1; ¹³C-NMR表2; EIMS m/z331[M]⁺(1), 263(45), 207(50), 191(75), 179(30), 133(100), 69(92); HR-EIMS m/z331.1766(C₁₉H₂₅NO₄についての計算値, 331.1783)。

エルゴステロールパーオキシド：無色の針状結晶(n-ヘキサン-アセトン); mp165-169 (lit²mp171-174)。

細胞毒性アッセイ . in vitro LLC腫瘍細胞アッセイを、スルホローダミンB(SRB)法によって実施した。50%増殖阻害(ED₅₀)をProbit法によって計算した。

【 0 0 2 2 】

結果と議論

Antrodia Camphorataの菌糸体のCHCl₃抽出物を、常相及び逆相シリカゲルで繰り返しクロマトグラフィーに掛け、エルゴステロールパーオキシドと共に、5種の新規なマレイン酸及びコハク酸誘導体(化合物1-5)を得た。

【 0 0 2 3 】

【表1】

表1. 化合物1-5の¹H-NMRスペクトルデータ(δ ppm, J=Hz)(500MHz, CDCl₃)

H	1	2	3	4	5
3	—	—	—	2.87 (1H, m)	3.08 (1H, m)
4	—	—	—	3.52 (1H, d, J=4.0)	4.07 (1H, d, J=8.0)
1'	2.59 (2H, d, J=7.0)	2.51 (2H, d, J=7.0)	2.50 (2H, d, J=7.0)	1.51 (1H, m), 1.72~1.84 (1H)	1.02 (1H, m), 1.42~1.48 (1H)
2'	2.12 (1H, sep, J=7.0)	2.06 (1H, sep, J=7.0)	2.05 (1H, sep, J=7.0)	1.72~1.84 (1H)	1.42~1.48 (1H)
3'	0.94 (6H, d, J=7.0)	0.90 (6H, d, J=7.0)	0.88 (6H, d, J=7.0)	0.70 (3H, d, J=6.5)	0.66 (3H, d, J=6.5)
4'	—	—	—	0.89 (3H, d, J=6.5)	0.80 (3H, d, J=6.5)
2'', 6''	7.50 (2H, d, J=9.0)	7.50 (2H, d, J=9.0)	7.50 (2H, d, J=9.0)	7.07 (2H, d, J=8.5)	6.96 (2H, d, J=9.0)
3'', 5''	7.02 (2H, d, J=9.0)	6.95 (2H, d, J=9.0)	6.98 (2H, d, J=9.0)	6.87 (2H, d, J=8.5)	6.84 (2H, d, J=9.0)
1'''	4.57 (2H, d, J=6.6)	4.56 (2H, d, J=6.5)	4.55 (2H, d, J=6.9)	4.47 (2H, d, J=6.5)	4.47 (2H, d, J=6.5)
2'''	5.50 (1H, brt, J=6.6)	5.50 (1H, brt, J=6.5)	5.49 (1H, brt, J=6.9)	5.47 (1H, brt, J=6.5)	5.47 (1H, brt, J=6.5)
4'''	1.81 (3H, s)	1.81 (3H, s)	1.81 (3H, s)	1.79 (3H, s)	1.79 (3H, s)
5'''	1.76 (3H, s)	1.76 (3H, s)	1.76 (3H, s)	1.73 (3H, s)	1.73 (3H, s)

【 0 0 2 4 】

10

20

30

40

【表 2】

表 2. 化合物 1-5 の ^{13}C -NMR スペクトルデータ (δ ppm)(125MHz, CDCl_3)

C	1	2	3	4	5
2	166.4 (s)	171.7 (s)	168.8 (s)	174.8 (s)	175.1 (s)
3	139.8 (s)	138.8 (s) ^{a)}	135.9 (s) ^{a)}	44.6 (d)	40.3 (d)
4	140.2 (s)	139.2 (s) ^{a)}	136.0 (s) ^{a)}	49.8 (d)	47.5 (d)
5	165.4 (s)	171.1 (s)	168.1 (s)	173.2 (s)	173.6 (s)
1'	33.6 (t)	32.8 (t)	33.2 (t)	40.4 (t)	35.3 (t)
2'	27.9 (d)	28.1 (d)	28.4 (d)	25.3 (d)	25.2 (d)
3'				21.3 (q)	21.8 (q)
4'	22.7 (q)	22.7 (q)	23.0 (q)	23.0 (q)	22.4 (q)
1''	119.9 (s)	121.2 (s)	120.8 (s)	127.9 (s)	125.1 (s)
2'', 6''	131.1 (d)	130.9 (d)	131.0 (d)	128.8 (d)	130.2 (d)
3'', 5''	115.1 (d)	114.9 (d)	115.0 (d)	115.4 (d)	115.0 (d)
4''	160.9 (s)	160.1 (s)	160.2 (s)	158.7 (s)	158.7 (s)
1'''	65.0 (t)	64.9 (t)	65.1 (t)	64.1 (t)	64.8 (t)
2'''	118.7 (d)	119.3 (d)	119.2 (d)	119.4 (d)	119.3 (d)
3'''	139.1 (s)	138.6 (s) ^{a)}	138.9 (s)	138.3 (s)	138.4 (s)
4'''	25.2 (q)	25.8 (q)	26.1 (q)	25.8 (q)	25.8 (q)
5'''	18.2 (q)	18.2 (q)	18.5 (q)	18.1 (q)	18.2 (q)

a) 割り当ては互換的であってよい。

【0025】

新規な化合物の構造を、以下のように測定した：

化合物 2 は、黄色の針状結晶であり、mp110-111 を有し、 $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ の分子式が HR-EIMS によって割り当てられた。IR スペクトルは、 1724cm^{-1} でイミドカルボニル吸収を示した。 ^{13}C -NMR スペクトルは、4 のメチル炭素、2 の目地連炭素、及び 1 の目チン炭素を脂肪族領域で示し、並びに 1 のベンゼン環、1 のオレフィン基、および 2 のカルボニル炭素を示した。 ^1H -NMR スペクトルは、0.90, 2.06 及び 2.51 でイソブチル部分の存在を、1.76, 1.81, 4.56 及び 5.50 で 3-メチル-2-ブテニルオキシ部分の存在、6.95 及び 7.50 でパラ-置換ベンゼン部分の存在を示し、それらは更に $1\text{H}-1\text{H}$ COSY (クーラーシンクロトロン) 及び HMQC (異核多重量子干渉) 実験によりサポートされた。図 1 に示されるように HMBC によって、広範囲の相関関係が観察された。分子式及び ^{13}C -NMR スペクトルに基づいて、この化合物は、一つの更なるカルボニル炭素を含む更なる CHNO 原子を含むと推定された。かくして、このあいまいな部分は、マレイミド基であると推測された。よってこの構造は、X 線分析によって、3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]-1H-ピロール-2,5-ジオンであると確立された。

【0026】

化合物 1 の分子式は、HR-EIMS によって $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_4$ と評価された。IR スペクトルにより、 1763cm^{-1} で酸無水物のカルボニル吸収が明らかとなった。化合物 1 の ^1H -NMR スペクトルは、化合物 2 のものと同じであり、イソブチル部分、3-メチル-2-ブテニルオキシ部分、及びパラ-置換ベンゼン環の存在を示した。HMBC スペクトルから、化合物 1 は化合物 2 に対して同じ部分構造を有することが示され (図 1)、そこではマレイン酸無水物基が、化合物 1 の分子式に基づいて推定され、それは後に 3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フ

エンル]フラン-2,5-ジオンと決定された。

【0027】

化合物3の分子式は、HR-EIMSにより $C_{19}H_{23}NO_4$ と評価された。IRスペクトルにより、 1717cm^{-1} でカルボニル吸収が示され、ヒドロキシイミドに割り当てられた。 ^1H -及び ^{13}C -NMRスペクトルもまた、化合物1及び2のものと同一であり、イソブチル部分、3-メチル-2-ブテニルオキシ部分、及びパラ-置換ベンゼン環の存在を示した。HMBC実験では、化合物3は、化合物2と同じ部分構造を有することが示された(図1)。化合物3は、化合物2より一つ多い酸素原子を含み、それゆえこの化合物は、(3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]-1H-ピロール-1-オール-2,5-ジオンであると決定された。

【0028】

化合物4及び5は、HR-EIMSにより同じ R_f 値と同じ分子式を有する($C_{19}H_{25}NO_4$ 、実測値はそれぞれ331.1747及び331.1766)が、それらは予備的HPLCによって分離できた。両化合物のIRスペクトルは、 1715cm^{-1} でのヒドロキシイミドカルボニル吸収を示した。 ^1H -及び ^{13}C -NMRスペクトルでは、両化合物は、イソブチル部分、3-メチル-2-ブテニルオキシ部分、及びパラ-置換ベンゼン環の存在を示したが、イソブチルメチレンプロトンは多重を示し、化合物1-3についてのような二重ではなかった。 ^1H - ^1H COSYスペクトルは、このメチレン基が-CH-CH-単位に結合していることを示した。化合物4及び5の ^{13}C -NMRスペクトルは、化合物1-3について観察される二つの sp^2 炭素シグナルの代わりに、二つの更なる sp^3 炭素シグナルを示した。それゆえ、化合物4及び5は、N-ヒドロキシマレイミドではなく、むしろN-ヒドロキシスクシンイミドであり、スクシンイミド環におけるC-3及びC-4の位置で立体中心を有した。化合物4及び5は、H-3とH-4の間のカップリング定数から(化合物4及び5について、それぞれ4.0及び8.0Hz)、それぞれトランス及びシスアイソマーであると決定された。化合物4のNOESY(核オーバーハウザー効果スペクトル測定)スペクトルにおいて、H-3とH-4の間でNOEは観察されない一方で、化合物5のものでは適切なNOEが観察された。化合物4及び5の旋光度は、それぞれ $+2.5^\circ$ 及び $+3.0^\circ$ を示した一方で、そのCDスペクトルは、いずれの波長でのコットン効果を示さず、化合物4及び5の両者がラセミ混合物であることを示唆する。いくつかの溶媒システムでのキラリカラムを使用するHPLCによるこれらのラセミ混合物の解像は不成功であった。現在では我々は、これらの化合物が、光学的に活性な化合物であるか、ラセミ混合物であるか明確に結論付けることはできない。かくしてそれらの相対的な構造は、それぞれ $3R^*$, $4S^*$ -及び $3R^*$, $4R^*$ -1-ヒドロキシ-3-イソブチル-4-[4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)フェニル]ピロリジン-2,5-ジオンであると決定された。

【0029】

天然からのこれらのタイプのマレイン酸及びコハク酸誘導体の単離は、Aquaveque等の報告によって二度引き続いた。

【0030】

クロロホルム抽出物と単離した化合物の細胞毒性活性を、LLC(ルイス肺カルシノーマ)細胞系を使用して調査した(表3)。クロロホルム抽出物は、 $26.7\mu\text{g/ml}$ の ED_{50} 値を有する穏やかな細胞毒性効果を示した。マレイン酸化合物1及び4は細胞毒性活性を有さない一方で、化合物2及び3は、クロロホルム抽出物のものより低い ED_{50} 値を有するLLC細胞系に対する細胞毒性を有することが見出された。

【0031】

【表 3】

表 3. LLC 細胞系に対する *Antrodia Camphorata* の菌糸体からの CHCl_3 抽出物と化合物 1-4 の 50 % 増殖阻害 (ED_{50}) 値

	ED_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
CHCl_3 抽出物	26.7
1	>20
2	3.6
3	7.5
4	>10
アドリアマイジン ^{a)}	0.14

10

a) ポジティブコントロール

【 0 0 3 2 】

ACM (*Antrodia Camphorata* 菌糸体パウダー) の腫瘍アッセイ

A. 細胞系

粘着細胞:

MCF-7: ヒト乳カルシノーマ

HT-29: ヒト大腸アデノカルシノーマ

KATO III: ヒト胃カルシノーマ

SW480: ヒト大腸アデノカルシノーマ

SW620: ヒト大腸アデノカルシノーマ

HepG2: ヒト肝臓カルシノーマ

懸濁細胞:

EL4: マウスリンパ腫

B. サンプル

化合物1、化合物3、ACM EtOH抽出物、ACM H_2O 抽出物

C. アッセイ法

ED_{50} の計算 (50 % 阻害の有効投与量)

接着細胞: MTT (メチルチアゾリルテトラゾリウム) 法: MCF-7, HT-29, KATO III, SW480, HepG2

細胞について3日間で測定し、SW620について4日間で測定する。

懸濁細胞: 細胞カウント法; EL4細胞について5日間でカウントする。

D. 結果

計算: $y = m \ln(x) + b$

例

【表 4】

X	Y
0	0.97
10 ppm	0.941
30 ppm	0.6
100 ppm	0.331

40

X (10, 30, 50 ppm) 及び Y の値を使用して、 $y = -0.2643 \ln(x) + 1.5321$ の相関曲線を得る。

$\text{ED}_{50} = \exp[(0.97/2 - 1.5321)/(-0.2643)]$

【 0 0 3 3 】

サンプルの調製及びサンプルの記載

A. ACM (*Antrodia Camphorata* 菌糸体パウダー) H_2O 抽出物

50

1. 250ml ビーカー中の40mlのRO H₂Oに1gのACMを加え、そのビーカーを室温で20分間超音波ウォーターバスに配置する。
2. 45分間45℃でウォーターバスを攪拌する。
3. ビーカーを超音波ウォーターバスに更に20分間配置する。
4. サンプルを3000rpmで15分間遠心分離する。
5. 上清を回収し、媒体で連続希釈を実施する。

B. サンプル濃度の測定

1. 蒸発皿を軽量する(W1)。
2. 蒸発皿に10mlのH₂O抽出物サンプルを加える。
3. 蒸発皿をオープンに配置し、水を除去する(W2)

10

$$\text{サンプル重量 / ml} = (W2 - W1) / 10$$

C. ACM(*Atrodia Camphorata*菌系体パウダー)EtOH抽出物

1. 500mlのビーカー中の20gのACMに100mlの95%アルコールを加え、室温で10分間攪拌する。
2. 懸濁物をAdvantec #1フィルターペーパーで濾過し、濾液を回収する。
3. 回転真空蒸発器によって濾液を濃縮し、アルコールを除去する。

D. 化合物1: ACM由来の純粋化合物

E. 化合物3: ACM由来の純粋化合物

【 0 0 3 4 】

MTTアッセイ法

20

1. 細胞増殖の後の古い培地を捨て、リン酸緩衝生理食塩水で一度細胞を洗浄する。
2. トリプシン-EDTAで細胞を洗い流す。
3. 1200rpmで5分間遠心分離し、上清を捨てる。
4. 10mlの培地でペレットを懸濁する。
5. 100 µlの細胞懸濁物を100 µlのトリパンブルーと混合し、生存細胞を計算する。
6. 96穴プレートの各ウェルに1 × 10⁴細胞/100 µlの培地を加え、37℃で24時間CO₂インキュベーターでプレートをインキュベートする。
7. 古い培地を捨て、細胞をPBSで一度洗浄する。
8. 各ウェルに100 µlのサンプルを加え、37℃でCO₂インキュベーターでプレートをインキュベートする。
9. 3日目、4日目、及び5日目で、細胞をPBSで一度洗浄する。
10. 各ウェルに57 µlのMTT(0.88mg/ml)を加える。
11. 4時間後MTTを捨て、細胞をPBSで一度洗浄する。
12. 50 µlのDMSO/ウェルを加える。
13. ElisaリーダーでOD545を読み取る。

30

細胞カウント法(EL4細胞系)

1. 遠心分離によって細胞増殖の後の古い培地を捨てる。
2. 新鮮な培地でペレットを再懸濁する。
3. 100 µlの細胞懸濁物を100 µlのトリパンブルーと混合し、生存細胞を計算する。
4. 1 × 10⁵細胞/mlのサンプルを含む、各種の濃度のサンプルを調製する。
5. 96穴プレートの各ウェルに100 µlのサンプルを乗せ、37℃でCO₂インキュベーターでプレートをインキュベートする。
6. 3日目、4日目、及び5日目で生存細胞を計算する。

40

PBS

NaCl 8g

KCl 0.2g

Na₂HPO₄ 1.4gKH₂PO₄ 0.2g

1Lの容量に調製する PH7.4

【 0 0 3 5 】

50

結果と議論

細胞系に対するACMのED₅₀

【表 5】

細胞系	HepG2	HT-29	KATO III	EL4	SW480	SW620	MCF-7
化合物 1	21 ppm	52 ppm	38 ppm	3.5 ppm		15 ppm	6 ppm
化合物 3	35 ppm	42 ppm	69 ppm	2.6 ppm	20 ppm	27 ppm	0.02 ppm
ACM EtOH 抽出物	32 ppm	52 ppm	156 ppm	2.6 ppm	71 ppm	4 ppm	
ACM H ₂ O 抽出物	295 ppm	707 ppm		20 ppm	207 ppm	132 ppm	318 ppm

【 0 0 3 6 】

詳細な試験結果は以下の通りである：

本発明の化合物3：HepG2(図 4 a)、EL4(図 4 b)、HT-29(図 4 c)、及びKatoIII(図 4 d)。

ACM H₂O抽出物：HepG2(図 5 a)、SW620(図 5 b)、及びEL4(図 5 c)。

ACM EtOH抽出物：HT-29(図 6 a)、SW480(図 6 b)、SW620(図 6 c)、EL4(図 6 d)、HepG2(図 6 e)、及びKatoIII(図 6 f)。

本発明の化合物1：MCF-7(図 7 a)、EL4(図 7 b)、HT-29(図 7 c)、SW620(図 7 d)、及びHepG2(図 7 e)。

前記記載の通り、本発明の化合物及びACM抽出物は、各種のタイプの腫瘍細胞に対して阻害効果を有することが示される。

【 0 0 3 7 】

高速液体クロマトグラフィー法による、ACM EtOH抽出物からの全ての新規な化合物(1,2及び3)の分析

目的：ACM EtOH抽出物からの全ての新規な化合物(1,2及び3)の量を測定するために、高速液体クロマトグラフィーを、我々のルーチンの定量制御方法として使用した。

ACM EtOH抽出物サンプルの準備：

- 1) デジタルバランスを使用することによって、100mLの95%アルコールを含むメモリのついた媒体研究室ボトルに20.000(g)のサンプルパウダーを正確に計量し、蓋を固くは閉めない。
- 2) 10分間超音波バス内に1)のサンプルボトルを配置する。
- 3) 液体サンプルを遠心チューブに注ぎ、そのサンプルを遠心分離機に配置し、6500rpm/5分の条件下で粗粒子を除去する。
- 4) 液体相をフィルタペーパーadvantec No.1で濾過する。
- 5) 回転真空蒸発器によって濾過溶液を濃縮し、粘性の黄色がかったアルコールフリーの液体を得る。
- 6) 工程1～5を三回繰り返し、全ての抽出産物を回収する(全ACM EtOH抽出物=4.60g)。収率を計算する。

【 0 0 3 8 】

水HPLC、モデル2690による適用

- 1) カラム：逆相C18
- 2) 移動相：MeOH、H₂O、アセトニトリル
- 3) 注入容量：20 µL
- 4) 検出容量：254nmでの波長でPhotodiode Array Detector 996
- 5) HPLC分析のため10mLのアルコール中の1.000(g)のACM EtOH抽出物サンプルを調製する*

。

【 0 0 3 9 】

結果:HPLC分析によって、抽出産物は、以下の表4に示される純粋な化合物1,2及び3を含む：

表 4

【表 6】

3種の標準化合物の成分について：1mLのアルコール中 0.0100(g)の重量			
標準名	化合物 1	化合物 2	化合物 3
濃度(g/mL)	0.01	0.01	0.01
ピーク領域	49,315,783	129,327,136	136,255,406
溶出時間(分)	134.8	124.3	119.8
ACN EtOH 抽出サンプルについて：10mLのアルコール中 1.000(g)の重量			
濃度(g/mL)	8.59×10^{-3}	5.59×10^{-4}	1.659×10^{-2}
ピーク領域	42,374,766	7,226,937	226,102,223
収率%(w/w)	8.59	0.559	16.59

10

それ故、化合物1,2及び3の全重量は、ACMサンプル中に5.92重量%である。

【 0 0 4 0 】

ACM-EtOH抽出物についての試験

20

材料及び装置

1. 試験物質及び投与量パターン

試験物質を、2% Tween 80のビヒクル中で全てのin vivoアッセイのため1000mg/kgの初期投与量で経口的に投与した。各アッセイについての観察時間を「方法」に記載した。

2. 動物

オスまたはメスのICRマウス、Wistar-Okamoto由来のオスの自発的に低血圧のラット(SHR)、MDS Pharma Services Taiwan Ltd.によって提供されるWistar and Long Evans由来のラットを使用した。動物についての空間の割り当ては以下の通りであった：10のマウスについて29×18×13cm、6のラットについて45×23×21cm、及び3のモルモットについて45×23×21cm。マウス及びラットをAPEC^Rケージで飼育した。免疫適格C57BL/6Jオスマウス、6-8週齢、体重21+/-2gmもまたこの研究で使用し、それはNational Taiwan University Animal Centerによって提供された。動物を、individually Ventilated Cages Racks (IVCラック、36 Mini Isolator System)で飼育した。全ての動物を、制御温度(21-23℃)及び湿度(60-70%)の環境で、12時間の明暗サイクルで、使用の前に研究室で少なくとも1週間維持した。標準的な実験用の食餌(LabDiet Rodent Diet及びGuinea Pig Diet, PMI Nutrition International, USA)及び生水に自由に接近できるようにした。

30

3. 細胞系及び培養培地

げっ歯類メラノーマ細胞系、B16-F0 (ATCC CRL-6322)を、American Type Culture Collectionから購入し、ダルベッコ修飾イーグルス培地(GIBCO, USA)を、培養培地として使用した。腫瘍細胞を、37℃で5%CO₂を含む大気中でインキュベートした。

40

4. 化学物質

一般論：

蒸留水(社内)、ジメチルスルホキシド(DMSO, Merck, Germany)、等張性塩化ナトリウム溶液(Sintong Chemical Industry Co. Ltd., R.O.C.)、硫酸マグネシウム(MgSO₄·7H₂O, Wako, Japan)、メクロフェナートナトリウム(Sigma, USA)、メチルセルロース(Sigma, USA)、水酸化ナトリウム(NaOH, Wako, Japan)、リン酸緩衝生理食塩水(Sigma, USA)、及びTween 80(Wako, Japan)。

試薬

グリコース-HAアッセイキット(Wako, Japan)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)アッセイキット(Wako, Japan)、アスパラタートアミノトランスフェラーゼ(AST)アッセイ

50

キット(Wako, Japan)、T-コレステロール-HA及びHDLアッセイキット(Wako, Japan)、Hemo lync 3 Hemolys (Nihon Kodon, Japan)、Isotonic 3 Diluent (Nihon Kodon, Japan)。

5. 装置

一般的使用:

動物かご(ShinTeh, R.O.C.)、ビーカー250ml及び1000ml(Kinmax, USA)、使い捨てシリンジ(1ml, Top Corporation, Japan)、ステンレス鉗子(Klappencker, Germany)、マウススケール#Z-40(Taconic, USA)、経口投与針(Natsune, Japan)、皮下注射針23G×1"(Top Corporation, Japan)、pHメーター(Suntex, USA)、ラットスケール500g±2g(Chien-chun, ROC)、ガラスシリンジ1ml, 2ml及び5ml(Mitsuba, Japan)、及びステンレスハサミ(Klappencer, Germany)。

【0041】

方法及び結果

1. コリン作用性アゴニズム、中枢/抹消(Lippmann W and Pugsley TA. Arch Int Pharmacodyn. 227: 324, 1977)

試験物質を、150±20gの体重のWistar由来のオスまたはメスのラットの一群に経口的に投与した。その後30-60分の期間の間、累積的に測定して10秒より長い嘔む挙動(口及び/または舌の動き)を示す動物の数、及び唾液分泌を示す動物の数を記録した。3のラットの2以上(2)で観察されるポジティブの応答は、中枢のコリン作用性活性及び抹消のコリン作用性活性の可能性を示す。

表5: コリン作用性アゴニズムの結果、ラットにおける中枢/抹消

【表7】

治療	経路	投与量	N	中枢		抹消	
				嘔むこと	スコア	唾液分泌	スコア
ビヒクル	PO	10ml/kg	1	—		—	
			2	—		—	
			3	—	0/3	—	0/3
ACM-EtOH 抽出物	PO	1000mg/kg	1	+		—	
			2	+		—	
			3	+	(3/3)	—	0/3
		300mg/kg	1	—		—	
			2	—		—	
			3	+	1/3	—	0/3
アセトニトリル -HBR	IP	30mg/kg	1	+		+	
			2	+		+	
			3	+	(3/3)	+	(3/3)

ビヒクル及び試験物質を経口的に投与し(PO)、一方で対照化合物を腹腔内に注射した(IP)。その後の30-60分の期間の間、累積的に測定して10秒より長い嘔む挙動(口及び/または舌の動き)を示す動物の数、または唾液分泌を示す動物の数を記録した。3のラットの2以上(2)で観察されるポジティブの応答は、中枢のコリン作用性活性及び抹消のコリン作用性活性の可能性を示す。

【0042】

2. 心臓血管、血圧及び脈拍(SHR 0,1,2,4時間)(Yen TT等, Life Sci. 22: 359, 1978)

250±20gの体重のWistar-Okamoto由来のオスの自発的に高血圧のラット(SHR)3匹の群を使用した: 平均の収縮期の血圧は200±20mmHgであり、心拍は400±30ビート/分であった。血圧と心拍を、試験物質またはビヒクルの経口投与の前(0時間)及び投与後1,2及び4時間で、温度制御された環境(32±1℃)で、テールカフ法によって間接的に記録した。0

時間に対する各測定された時間間隔での、10パーセント以上(10%)までの収縮期の血圧の減少、または20パーセント以上(20%)までの心拍の減少は、有意であると考慮される。

【 0 0 4 3 】

【表 8】

表6：心臓血管の結果、ラットにおける血圧(SHR0,1,2,4時間)

治療	経路	投与量	N	%コントロール (0時間から)		
				1時間	2時間	4時間
ビヒクル	P O	10ml/kg	1	1 0 0	9 6	9 0
			2	9 7	1 0 0	9 1
			3	9 0	9 2	9 2
			平均	9 6	9 6	9 1
ACM-EtOH 抽出物	P O	1000mg/kg	1	7 8	8 5	7 1
			2	8 6	8 9	8 0
			3	8 9	8 9	8 9
			平均	(8 4)	(8 8)	(8 0)
クロニジン	P O	0.1mg/kg	1	7 1	6 7	7 1
			2	9 5	8 6	8 8
			3	7 2	8 5	6 9
			平均	(7 9)	(7 9)	(7 6)

【 0 0 4 4 】

【表 9】

表7：心臓血管の結果、ラットにおける心拍(SHR0,1,2,4時間)

治療	経路	投与量	N	%コントロール (0時間から)		
				1時間	2時間	4時間
ビヒクル	P O	10ml/kg	1	8 7	1 0 0	9 9
			2	1 1 6	1 0 3	1 0 7
			3	1 0 8	1 0 4	1 2 1
			平均	1 0 4	1 0 2	1 0 9
ACM-EtOH 抽出物	P O	1000mg/kg	1	9 8	9 3	9 5
			2	8 1	1 0 0	8 8
			3	8 3	7 8	9 2
			平均	8 7	9 0	9 2
クロニジン	P O	0.1mg/kg	1	6 2	9 7	1 1 2
			2	8 4	8 7	1 0 4
			3	6 8	8 6	7 8
			平均	(7 1)	9 0	9 8

【 0 0 4 5 】

200+/-20mmHgの収縮期の血圧及び400+/-50mmHgビート/分の心拍を有するSHRを使用した。ビヒクルまたは試験物質の経口投与の後0時間(投与前)及び1,2及び4時間で、テールカフによって間接的に血圧を記録した。0時間に対する各測定時点での、10パーセント以上(10%)までの血圧の減少、または20パーセント以上(20%)までの心拍の減少は、有意で

10

20

30

40

50

あると考慮される。

ビヒクル 10ml/kg 0時間229mmHg及び403mmHgビート/分を100%とした。

ACM-EtOH抽出物 1000mg/kg 0時間223mmHg及び452mmHgビート/分を100%とした。

クロニジン 0.1mg/kg 0時間228mmHg及び379mmHgビート/分を100%とした。

【 0 0 4 6 】

【表 1 0】

表 8：心臓血管の結果、ラットにおける血圧(SHR0,1,2,4 時間)

治療	経路	投与量	N	%コントロール (0 時間から)		
				1 時間	2 時間	4 時間
ビヒクル	P O	10ml/kg	1	9 4	9 7	9 7
			2	8 8	9 7	9 4
			3	9 4	9 7	1 0 3
			平均	9 2	9 7	9 8
ACM-EtOH 抽出物	P O	300mg/kg	1	1 1 1	1 0 2	1 0 3
			2	9 4	8 4	1 0 0
			3	1 1 2	1 1 0	1 1 2
			平均	1 0 6	9 9	1 0 5
クロニジン	P O	0.1mg/kg	1	8 6	7 3	8 1
			2	6 3	7 3	9 0
			3	6 2	6 8	8 0
			平均	(7 0)	(7 1)	(8 5)

【 0 0 4 7 】

【表 1 1】

表 9：心臓血管の結果、ラットにおける心拍(SHR0,1,2,4 時間)

治療	経路	投与量	N	%コントロール (0 時間から)		
				1 時間	2 時間	4 時間
ビヒクル	P O	10ml/kg	1	8 2	8 5	8 4
			2	8 8	1 1 5	1 0 2
			3	1 0 9	1 1 1	1 1 9
			平均	9 3	1 0 4	1 0 2
ACM-EtOH 抽出物	P O	300mg/kg	1	9 7	9 6	9 2
			2	1 0 5	1 0 8	9 8
			3	8 5	9 6	8 2
			平均	9 6	1 0 0	9 1
クロニジン	P O	0.1mg/kg	1	7 7	8 5	1 0 2
			2	7 8	7 8	1 0 0
			3	6 2	9 4	1 0 4
			平均	(7 2)	8 6	1 0 2

【 0 0 4 8 】

200+/-20mmHgの収縮期の血圧及び400+/-50mmHgビート/分の心拍を有するSHRを使用した。ビヒクルまたは試験物質の経口投与の後0時間(投与前)及び1,2及び4時間で、テールカフによって間接的に血圧を記録した。0時間に対する各測定時点での、10パーセント以上(

10

20

30

40

50

10%)までの血圧の減少、または20パーセント以上(20%)までの心拍の減少は、有意であると考慮される。

ビヒクル	10ml/kg	0時間220mmHg及び410mmHgビート/分を100%とした。
ACM-EtOH抽出物	300mg/kg	0時間205mmHg及び446mmHgビート/分を100%とした。
クロニジン	0.1mg/kg	0時間235mmHg及び417mmHgビート/分を100%とした。

【 0 0 4 9 】

3. コレステロール、血清(トータルHDL、トータル/HDL、割合)、食餌誘導性(Schurr PE等, Atherosclerosis Drug Discovery. Plenum, New York, pp. 215-229, 1976)

22+/-2gの体重の5匹のICR由来オスマウスの群を、7日間高脂肪の食餌(g/100g: ココナツツ油, 8; コレステロール, 1.0; コール酸, 0.3; ラード, 2; 標準食, 88.7)で維持した。試験物質を5, 6及び7日目で経口的に投与した。一晚絶食させた後、各マウスから血清を得て、トータルコレステロール(トータル)、高密度リポ蛋白質(HDL)、及びトータル/HDLの変化パーセントについてアッセイした。ビヒクルで処理されたコントロール動物に対して、血清トータルの20パーセント以上(20%)の減少、または血清HDLの20パーセント以上(20%)の増加、またはトータル/HDL比の40%以上(40%)の減少は、有意であると考慮される。

【 0 0 5 0 】

【表 12】

表 10：コレステロールの結果、(トータル／HDL、トータル／HDL 比)、マウスにおける食事誘導性

治療	経路	投与量	N	トータル		HDL		トータル／HDL	
				個体	%減少	個体	%減少	個体	%減少
ビヒクル	PO	10ml/kg × 3	1	3 6 1		7 0		5. 1 6	
			2	3 1 6		8 2		3. 8 5	
			3	3 7 9		7 9		4. 8 0	
			4	3 9 2		7 8		5. 0 3	
			5	3 6 7		8 6		4. 2 7	
			平均	3 6 3	--	7 9	--	4. 5 9	--
ACM-EtOH 抽出物	PO	1000mg/kg × 3	1	4 2 0		1 1 7		3. 9 5	
			2	3 2 7		1 1 5		2. 8 4	
			3	3 3 2		1 0 4		3. 1 9	
			4	3 6 3		9 8		3. 7 0	
			5	2 9 4		1 1 7		2. 5 1	
			平均	3 4 7	4	1 1 0	(3 9)	3. 1 5	3 1
	PO	300mg/kg × 3	1	3 7 0		6 6		5. 6 1	
			2	3 0 1		6 5		4. 6 3	
			3	2 1 7		7 4		2. 9 3	
			4	3 7 9		7 6		4. 9 9	
			5	3 2 8		9 8		3. 3 5	
			平均	3 1 9	1 2	7 6	- 4	4. 2 0	8
ベンザフィ ブラート	PO	100mg/kg × 3	1	2 3 0		9 1		2. 5 3	
			2	2 1 4		1 2 0		1. 7 8	
			3	2 2 5		1 3 3		1. 6 9	
			4	2 3 1		1 2 3		1. 8 8	
			5	2 4 2		9 7		2. 4 9	
			平均	2 2 8	(3 7)	1 1 3	(4 3)	2. 0 2	(5 6)

【0051】

ビヒクル、試験物質、または対照ポジティブ化合物を、高コレステロール食餌を与えた後、5,6及び7日目で経口投与した(PO)。第3の投与の24時間後で、一晚絶食した動物を殺傷し、血清トータルコレステロール(トータル)及び高密度リポ蛋白質(HDL)を評価した。血清トータルの20パーセント以上(20%)の減少、または血清HDLの20パーセント以上(20%)の増加、またはトータル/HDL比の40%以上(40%)の減少は、有意であると考慮される。

【0052】

4. 肝臓傷害、D-ガラクトサミン(Wrobel J等, J. Med Chem 41: 1084, 1998)

200+/-20gの体重の5匹のWistar由来オスラットの群を使用した。各動物を、D-ガラクトサミンの単一の注射(500mg/kg, IP)で処理した。D-ガラクトサミン投与前0.5時間、東予語4時間及び8時間で、試験物質を経口的に投与し、動物を24時間後に殺傷した。血清アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)及びアスパラタートアミノトランスフェラーゼ(AST)レベルを、HITACHI自動分析器(モデル7050)で最適化UV法によって測定した。ビヒクルで処

理されたコントロール動物に対する30パーセント以上(30%)までのALTまたはAST活性の減少が、有意な保護であることを示す。

【 0 0 5 3 】

【表 1 3】

表 1 1 : 肝臓傷害の結果、ラットにおけるガラクトサミン

治療	経路	投与量	N	血清 ATL (X+/-SEM)		血清 AST (X+/-SEM)	
				U/L	%減少	U/L	%減少
ビヒクル	P O	10ml/kg × 3	1	8 1 6	--	1 6 2 8	--
			2	1 0 4 4		1 7 1 6	
			3	6 5 2		8 8 8	
			4	6 5 6		8 2 8	
			5	6 4 4		9 5 6	
			X	7 6 2 . 4		1 2 0 3 . 2	
			SEM	7 7 . 4		1 9 3 . 0	
ACM-EtOH 抽出物	P O	1000mg/kg × 3	1	3 6 4	(4 4)	5 1 6	(5 7)
			2	3 7 6		5 3 2	
			3	5 9 6		6 7 2	
			4	4 5 2		5 2 4	
			5	3 3 6		3 5 6	
			X	4 2 4 . 8		5 2 0 . 0	
			SEM	4 6 . 9		5 0 . 1	
		300mg/kg × 3	1	4 6 0	2 0	8 5 2	2 8
			2	6 5 6		8 8 0	
			3	6 4 0		8 7 6	
			4	7 5 2		1 0 0 4	
			5	5 3 6		6 9 2	
			X	6 0 8 . 8		8 6 0 . 8	
			SEM	5 0 . 6		4 9 . 8	
グアニン	P O	300mg/kg × 3	1	5 0 8	(3 4)	6 5 6	(3 3)
			2	5 3 2		9 1 2	
			3	4 1 2		7 7 6	
			4	4 3 6		6 5 2	
			5	6 3 6		1 0 2 8	
			X	5 0 4 . 8		8 0 4 . 8	
			SEM	3 9 . 6		7 3 . 4	

【 0 0 5 4 】

ガラクトサミンの単一の投与(500mg/kg, IP)前0.5時間、及び投与後4,8時間で、試験物質及びビヒクルを経口的に投与した。ガラクトサミン注射の24時間後でラットを殺傷し、ALT及びAST値を測定した。ビヒクル群に対するALT及びASTの 30%の減少が、有意であると考慮される。

【 0 0 5 5 】

5.炎症、カラギーナン(Winter CA等, Proc Soc Exp Biol Med. 111: 544, 1962)

150+/-20gの体重のLong Evans由来オスまたはメスの一晩絶食したラットの群を、実験の前一晩絶食した。カラギーナンの注射を右の後脚に受ける(0.1mlの1%懸濁物、脚の裏内に)1時間前に、試験物質を経口的に投与した。炎症の測定として後脚の浮腫を、ウォーターセル(25mmの直径)を有する肢体容積測定器を使用して、カラギーナン投与の3時間後に記録した。30パーセント以上(30%)までの後脚の浮腫の減少は、有意に急性の抗炎症活性を示す。

【0056】

【表14】

表12. 炎症の結果、ラットにおけるカラギーナン

治療	経路	投与量	N	脚の体積(×0.01ml)			%阻害
				R.P.	L.P.	差異	
ビヒクル	PO	10ml/kg	1	194	103	91	
			2	202	108	94	
			3	199	104	95	
			平均	198	105	93	
ACM-EtOH 抽出物	PO	1000mg/kg	1	146	101	45	
			2	147	95	52	
			3	160	104	56	
			平均	151	100	51	(45)
アスピリン	PO	150mg/kg	1	152	102	50	
			2	146	102	44	
			3	163	106	57	
			平均	154	103	50	(46)

【0057】

【表15】

表13. 炎症の結果、ラットにおけるカラギーナン

治療	経路	投与量	N	脚の体積(×0.01ml)			%阻害
				R.P.	L.P.	差異	
ビヒクル	PO	10ml/kg	1	193	105	88	
			2	198	107	91	
			3	199	102	97	
			平均	197	105	92	
ACM-EtOH 抽出物	PO	300mg/kg	1	195	104	91	
			2	187	103	84	
			3	196	103	93	
			平均	193	103	89	3
アスピリン	PO	150mg/kg	1	146	103	43	
			2	149	101	48	
			3	169	104	65	
			平均	155	103	52	(43)

カラギーナンの右後脚(R.P.)への注射(0.1mlの1%懸濁物、脚の裏内に)の1時間前に、一段絶食したラットにビヒクルまたは試験物質を投与した;左の後脚(L.P.)は何も注射しなかった。カッコ内で示される30パーセント以上(30%)までの後脚の浮腫の減少は、有意な急性の抗炎症活性を示す。

【0058】

6. 腫瘍、同一遺伝子型、メラノーマ、B16-F0細胞(Farrugia CA and Groves MJ. Anticancer Research 19: 1027-1032, 1999)

特定の病原体フリー(SPF)条件の下で動物単離箱(IVCラック)で飼育された、5匹の免疫適格性(6-8週齢)、病原体フリー(SPF)C57BL/6Jメスマウスの群を使用した。C57BL/6Jマウスに同系遺伝子型である、生存可能なB16-F0げっ歯類メラノーマ細胞(ATCC CRL-6322, 0.2ml中に 1.0×10^5)を、実験マウスの背側内に皮下で注射した。腫瘍のイノキュレート24時間後に処理を開始し、21日間、または毒性の明らかな兆候が見られる場合はそれ未満の間、経口栄養によって毎日試験化合物を投与した。体重、腫瘍サイズ、及び1日目から22日目の生存開始について、マウスをモニターした。更に処理マウスを、45日目で実験の最後まで生存についてモニターした。

腫瘍重量(mg)を、長楕円についての式:長さ(mm)×[幅(mm)]²によって見積もり、ここで特定の重力を1とし、を3と仮定した。化合物を処理された動物における腫瘍重量を、T/C(処理/コントロール)×100%として計算した;T/Cの値が42%であると、抗腫瘍活性を示す有意なものと考慮した。T/C(処理/コントロール)の平均生存時間が125%であることもまた、抗腫瘍活性を示す有意なものと考慮する。

【0059】

【表16】

表14: 腫瘍の結果、同一遺伝子型メラノーマ B16-F0 細胞

治療	経路	投与量	N	腫瘍重量(mg)及び% T/C、平均±SEM					
				1日目	T/C (%)	8日目	T/C (%)	11日目	T/C (%)
ビヒクル	PO	10ml/kg × 21	1	0		0		60	
			2	0		39		298	
			3	0		0		49	
			4	0		54		541	
			5	0		21		117	
				0	100	23±11	100	213±93	100
ACM-EtOH 抽出物	PO	1000mg/kg × 21	1	0		0		0	
			2	0		0		0	
			3	0		0		0	
			4	0		0		14	
			5	0		0		32	
				0	100	0±0	0*	9±6	4*
マイトマイ シン	IP	2mg/kg × 6	1	0		0		0	
			2	0		0		64	
			3	0		0		0	
			4	0		0		68	
			5	0		0		41	
				0	100	0±0	0*	34±15	16*

【 0 0 6 0 】

【表 1 7】

表 1 5 : 腫瘍の結果、同一遺伝子型メラノーマ B16-F0 細胞

治療	経路	投与量	N	腫瘍重量(mg)及び% T/C、平均+/-SEM					
				1 5 日 目	T/C (%)	1 8 日 目	T/C (%)	2 2 日 目	T/C (%)
ビヒク ル	P O	10ml/kg × 21	1	2 1 1		7 4 6		2 0 5 4	
			2	6 5 7		1 5 9 7		2 8 7 0	
			3	2 1 6		6 6 9		1 4 1 9	
			4	8 3 5		2 4 5 5		3 6 8 8	
			5	2 4 0		7 2 6		1 6 8 2	
				432+/-131	1 0 0	1239+/-349	1 0 0	2343+/-416	1 0 0
ACM-Et OH 抽出物	P O	1000mg /kg × 21	1	4 9		2 8 0		9 1 3	
			2	6 2		6 3 0		1 5 4 5	
			3	3 8 8		1 0 7 9		2 5 6 0	
			4	1 4 8		4 3 5		1 5 1 4	
			5	2 2 9		5 3 5		1 6 3 7	
				175+/-62	4 1 *	592+/-135	4 8	1634+/-265	7 0
マイト マイシ ン	I P	2mg/kg × 6	1	3 6		2 5 6		4 3 7	
			2	1 3 6		8 4 9		1 2 4 8	
			3	0		0		0	
			4	2 1 3		5 2 5		6 6 3	
			5	2 0 7		3 2 7		死亡	
				119+/-44	2 7 *	391+/-142	3 2 *	587+/-260	2 5 *

【 0 0 6 1 】

全部で21の投与による腫瘍細胞の移植の24時間後で、毎日動物にビヒクル及び試験物質を投与した。同時に、対照化合物、マイトマイシンを、全部で6の投与で毎週二回でIP投与した。腫瘍サイズを測定し、22日間の期間毎週二回記録した。腫瘍阻害を、T/C(処理/コントロール)×100として計算した。42%のT/C値は、抗腫瘍活性を示す有意なものと考慮された。

【 0 0 6 2 】

10

20

30

【表 18】

表 16 : 腫瘍の結果、同一遺伝子型メラノーマ B16-F0 細胞

治療	経路	投与量	N	体重(g)、平均 \pm SEM					
				1日目	8日目	11日目	15日目	18日目	22日目
ビヒクル	PO	10ml/kg $\times 21$	1	21	20	20	21	22	25
			2	22	22	21	22	26	30
			3	21	21	20	20	22	21
			4	21	20	20	20	21	24
			5	22	21	20	19	20	23
				21.4 \pm 0.2	20.8 \pm 0.4	20.2 \pm 0.2	20.4 \pm 0.5	22.2 \pm 1.0	24.6 \pm 1.5
ACM-EtOH 抽出物	PO	1000mg/kg $\times 21$	1	20	21	21	22	22	23
			2	20	19	19	21	22	24
			3	20	18	18	19	21	26
			4	21	20	19	21	20	21
			5	20	20	21	22	23	25
				20.2 \pm 0.2	19.6 \pm 0.5	19.6 \pm 0.6	21.0 \pm 0.5	21.6 \pm 0.5	23.8 \pm 0.9
マイトマイシン	IP	2mg/kg $\times 6$	1	25	25	26	25	24	27
			2	22	22	22	25	27	30
			3	19	21	21	21	22	21
			4	22	22	22	24	26	27
			5	19	20	19	20	21	死亡
				21.4 \pm 1.1	22.2 \pm 0.8	22.0 \pm 1.1	23.0 \pm 1.0	24.0 \pm 1.1	26.3 \pm 1.9

【0063】

全部で21の投与による腫瘍細胞の移植の24時間後で、毎日動物にビヒクル及び試験物質を投与した。同時に、対照化合物、マイトマイシンを、全部で6の投与で毎週二回でIP投与した。腫瘍サイズを測定し、22日間の期間毎週二回記録した。スチューデント検定を使用して、試験化合物群とビヒクルコントロール群の間の体重の変化の有意な差異を測定した。

【0064】

【表 19】

表 17：腫瘍の結果、同一遺伝子型メラノーマ B16-F0 細胞

治療	経路	投与量	N	生存時間(日)、平均+/-SEM	
				治療後の日数	T/C(%)
ビヒクル	P O	10ml/kg × 21	1	2 3	
			2	2 8	
			3	3 0	
			4	2 8	
			5	2 7	
				27.2+/-1.2	1 0 0
ACM-EtOH 抽出物	P O	1000mg/kg × 21	1	4 4	
			2	3 1	
			3	2 5	
			4	4 2	
			5	3 2	
				34.8+/-3.6	1 2 8 *
マイトマイ シン	I P	2mg/kg × 6	1	4 5 ^a	
			2	2 8	
			3	4 5 ^a	
			4	3 0	
			5	2 2	
				34.0+/-4.7	1 2 5 *

a. 動物は45日間を通じて死亡せず、生存日数は45日とした。

45日目の実験の終了日、または試験動物が死亡した日まで、生存について処理動物をモニターした。125%のT/C(処理/コントロール)の平均生存時間もまた、抗腫瘍活性を示す有意なものと考慮される。

【 0 0 6 5 】

議論：

社内で確立された指標にしたがって、経口的に投与された(PO)ACM-EtOH抽出物は、以下のマウス及びラットのアッセイにおいて有意な活性を引き起こした。

中枢コリン作用性アゴニズムは、ラットにおいて100mg/kgで観察された；最小で有意でないアゴニズムは、300mg/kgで観察された；有意でないアゴニズムまたは末梢コリン作用性神経に対するアンタゴニズムは、100mg/kgで観察された(表5)。

収縮期の血圧の減少(0時間での100%に対して1,2及び4時間の観察でそれぞれ16%,12%及び20%)及び自発的に高血圧(SH)のラットにおいて100mg/kgでの心拍の関連する穏やかで有意でない減少(表6及び7)；300mg/kgの投与量は、収縮期の血圧も心拍も有意な変化を引き起こさなかった(表8及び9)。

食餌誘導性のマウスにおける100mg/kgでの高密度リポ蛋白質の増大(HDL, ビヒクルコントロールに対して39%)(表10)；関連するトータルコレステロール(トータル)は有意に変化しなかった一方、HDL/トータル比は有意に31%近くに減少した；300mg/kgの投与量は、トータル、HDL、及びHDL/トータル比の有意な変化を引き起こさなかった(表10)。

1000mg/kg × 3でのラットにおいてガラクトサミンで誘導された肝臓傷害からの肝臓保護(ビヒクルコントロールに対して44%のALTの減少と57%のASTの減少)；300mg/kg × 3ではALTの20%及びASTの28%の穏やかな減少が観察された(表11)。

1000mg/kgでのラットにおけるカラギーナン誘導性の脚の浮腫に対する抗炎症性(ビヒクルコントロールに対して45%の阻害(表12) ; より低い濃度の300mg/kgでは、有意な活性は示さなかった(ビヒクルに対して3%の阻害、表13)。

8日目、11日目、及び15日目でのC57BL/6Jマウスに対する同一遺伝子型メラノーマB16-F0における抗腫瘍活性、並びに1000mg/kgでの動物の生存時間の長期化(表17) ; 動物の体重は有意に変化しなかった(表16)。

【 0 0 6 6 】

ACM、ACM-EtOH抽出物、及び本発明の化合物3についての試験

それぞれ5匹のICR由来メスラット(体重22+/-2g)の9の群を使用した。各動物を、単一投与量の四塩化炭素(CCl_4 、50%オリーブ油中に0.1ml/kg、PO)でチャレンジした。300及び1000mg/kgの投与量でのACM、及び30、100、及び300mg/kgでの本発明の化合物3の試験物質を、 CCl_4 チャレンジの30分前及び4、8時間後で経口的に投与した;一方で経口的に投与された300及び1000mg/kgでのACM-EtOH抽出物を、四塩化炭素の一日前(一日二度)及び30分前、並びに4,8時間後で予備処理した。アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)及びアスパラタートアミノトランスフェラーゼ(AST)濃度を、HITACHI自動分析器(モデル7050)を使用して最適化UV法によって測定した。ビヒクル群に対して30パーセント以上(30%)までのALT及びAST濃度の減少は、肝臓傷害からの有意な保護を示す。

【 0 0 6 7 】

【表 20 a】

表 18. 肝臓傷害のアッセイ、マウスにおける四塩化炭素

治療	経路	投与量	N	ATL		AST	
				U/L	%減少	U/L	%減少
ビヒクル (2%Tween 80)	P O	10ml/kg × 3	1	3 9 3 6	0	2 0 5 6	0
			2	3 4 5 6		1 8 5 6	
			3	3 7 1 2		1 5 2 8	
			4	2 5 6 0		1 3 2 8	
			5	2 9 6 8		1 9 6 9	
			X	3 3 2 6		1 6 9 3	
			SEM	2 5 0		1 2 6	
ACM	P O	1000mg/kg × 3	1	1 4 4 0	(4 6)	8 8 8	(3 6)
			2	2 7 2 0		1 5 2 0	
			3	2 2 7 2		1 3 2 8	
			4	1 2 7 2		7 9 2	
			5	1 3 2 0		8 8 0	
			X	1 8 0 . 5		1 0 8 2	
		300mg/kg × 3	SEM	2 9 2	8	1 4 4	- 6
			1	2 3 3 6		1 2 5 6	
			2	1 5 5 2		1 0 7 2	
			3	3 7 2 0		1 5 1 2	
			4	3 8 1 6		2 3 3 6	
			5	3 9 5 2		2 7 9 2	
			X	3 0 7 5		1 7 9 4	
			SEM	4 8 0		3 3 0	
ACM-EtOH 抽出物	P O	1000mg/kg × 5	1	1 9 3 6	(3 6)	1 2 3 2	2 5
			2	1 5 2 8		7 6 8	
			3	1 8 9 6		1 1 3 6	
			4	2 7 5 2		1 6 5 6	
			5	2 4 7 2		1 5 9 2	
		300mg/kg × 5	X	2 1 1 7	(3 4)	1 2 7 7	2 0
			SEM	2 1 9		1 6 2	
			1	1 6 5 6		9 7 6	
			2	3 5 3 6		1 7 1 2	
			3	2 3 2 8		1 8 0 8	
			4	1 7 3 6		1 4 1 6	
			5	1 7 9 2		8 8 8	
			X	2 2 1 0		1 3 6 0	
			SEM	3 5 2		1 8 7	

10

20

30

40

【表 2 0 b】

治療	経路	投与量	N	ATL		AST	
				U/L	%減少	U/L	%減少
化合物 3	P O	300ml/kg × 3	1	1 3 6 8	(4 1)	7 7 6	(3 3)
			2	1 5 7 6		8 9 6	
			3	1 4 4 0		8 9 6	
			4	2 7 2 8		1 3 5 2	
			5	2 7 2 0		1 7 2 8	
		100mg/kg × 3	X	1 9 6 6	0	1 1 3 0	- 1 7
			SEM	3 1 1		1 7 9	
			1	3 2 0 0		2 2 5 6	
			2	4 5 7 6		2 9 7 6	
			3	2 5 1 2		1 5 3 6	
		30mg/kg × 3	4	2 7 2 8	- 1	1 5 5 2	- 1 6
			5	3 6 9 6		1 6 0 0	
			X	3 3 4 2		1 9 8 4	
			SEM	3 7 0		2 8 2	
			1	4 2 9 6		2 1 3 6	
			2	3 6 9 6		2 2 8 8	
			3	2 1 5 2		1 0 9 6	
			4	2 4 0 0		1 7 9 2	
			5	4 2 5 6		2 4 9 6	
			X	3 3 6 0		1 9 6 2	
			SEM	4 5 7		2 4 5	
シリマリン	P O	100mg/kg × 3	1	2 8 5 6	(3 1)	1 2 9 6	(3 1)
			2	1 8 3 2		1 1 5 2	
			3	1 2 9 6		9 5 2	
			4	2 7 9 2		1 0 7 2	
			5	2 7 2 8		1 3 3 6	
			X	2 3 0 1		1 1 6 2	
			SEM	3 1 3		7 1	

【 0 0 6 8 】

議論

ACM、ACM-EtOH抽出物、及び本発明の化合物3を、ICRマウスにおいて四塩化炭素によって誘導された肝臓傷害からの保護活性の可能性について評価した。300及び1000mg/kgの投与量でのACM、30、100及び300mg/kgの投与量での本発明の化合物3を、CCl₄チャレンジの0.5時間前及び4,8時間後で試験動物に経口的に投与した。300及び1000mg/kgでのACM-EtOH抽出物について、2度の処理(b.i.d.)(9:00AM及び16:00PM)を、CCl₄の1日前になし、CCl₄チャレンジの0.5時間前及び4,8時間後に引き続き実施した(全部で5の投与)。肝臓傷害の度合いを、ビヒクル処理動物に対する血清アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)及びアスパラタートアミノトランスフェラーゼ(AST)濃度の増大によって測定した。1000mg/kg × 3でのACM、及び300mg/kg × 3での本発明の化合物3は、ビヒクル処理動物に対してALT(46%及び41%)及びAST(36%及び33%)の有意な減少を引き起こした。同時に300及び1000mg/kg × 5でのACM-EtOH抽出物も、ALT(36%及び34%)及びAST(25%及び20%)の有意な減少を引き起こし

た。同時に試験されたシリマリン(100mg/kg×3、IP)は、ビヒクル処理群に対してALT(31%)及びAST(31%)の有意な減少を示した。

ACM、ACM-EtOH、及び本発明の化合物3は、マウスのCCl₄モデルにおいて有意な肝臓保護活性の能力を有すると結論付けられる。

【0069】

本発明は、当業者が本発明を実施して使用することができるように、十分に詳細に記載され例示されているが、各種の変更、改変、改良が、本発明の精神及び範囲から離れることなく明らかなはずである。

【0070】

本発明が、その目的を実行し、言及された結果及び利点、並びにそこに存在するものを得るように十分採用されることを、当業者は容易に予測するであろう。細胞系、胚、動物、及びそれらを生産するための工程と方法は、好ましい実施態様を表し、例示的であり、本発明の範囲を制限することを企図しない。本発明に対する改変及び他の使用は、当業者に生ずるであろう。これらの改変は、本発明の精神に包含され、特許請求の範囲によって規定されている。

【0071】

各種の置換及び改変が、本発明の範囲及び精神から離れることなくここに開示された本発明になされ得ることは、当業者に容易に明白であろう。

【0072】

本明細書に言及されているすべての特許及び文献は、本発明が関連する技術分野の当業者のレベルの指標である。各個々の文献が、特定の且つ個々の参考として取り込まれるように指摘されているのと同程度に、すべての特許及び文献が、参考としてここに取り込まれる。

【0073】

ここに説明的に記載された本発明は、ここに特には開示されていないいずれかのエレメント(類)、制限(類)の不存在下で、適切に実施されても良い。使用されている用語及び表現は、記載のためのものであって、制限的なものとして使用されず、そのような用語及び表現が、示されて記載された特徴またはその一部のいずれかの同等物を排除するために使用されることは企図していないが、各種の改変が、特許請求の範囲に記載の発明に範囲内で可能であると認識される。かくして、本発明は、好ましい実施態様及び最適な特徴によって特定の開示されているが、ここに開示された概念の改変及び変更が当業者に生じ、そのような改変及び変更は、添付の特許請求の範囲によって規定された本発明の範囲内にあると考慮されることが理解されるべきである。

【0074】

他の実施態様は、添付の特許請求の範囲に示されている。

【図面の簡単な説明】

【0075】

【図1】図1は、化合物2のHMBC相関関係を示す図である。

【図2】図2は、本発明の化合物を示す図である。

【図3】図3は、本発明の化合物4及び5のNOE(核オーバーハウザー効果)相関関係を示す図である。

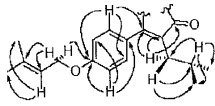
【図4】図4(a)-(d)は、本発明の化合物3の試験結果を示す図である。

【図5】図5(a)-(c)は、ACM(*Antrodia camphorata*菌系体パウダー)の水抽出物の試験結果を示す図である。

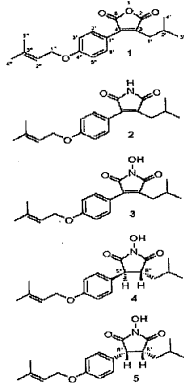
【図6】図6(a)-(f)は、ACMのEtOH(エチルアルコール)抽出物の試験結果を示す図である。

【図7】図7(a)-(e)は、本発明の化合物1の試験結果を示す図である。

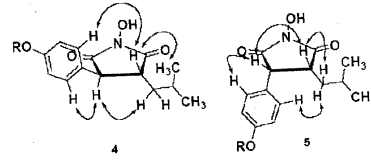
【図 1】



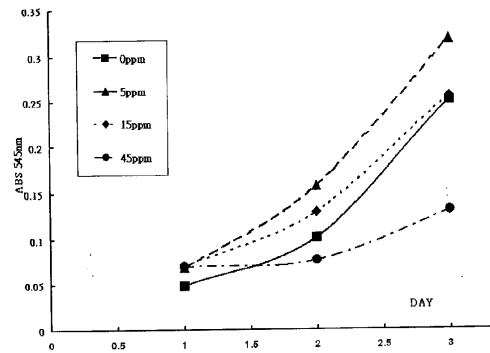
【図 2】



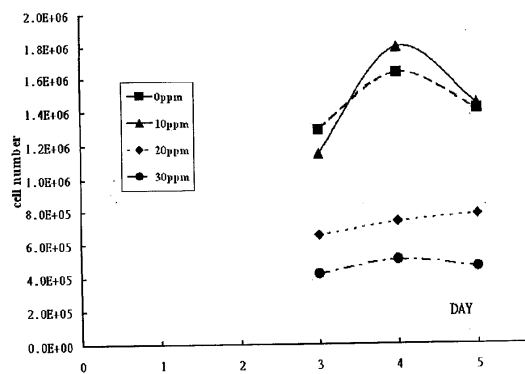
【図 3】



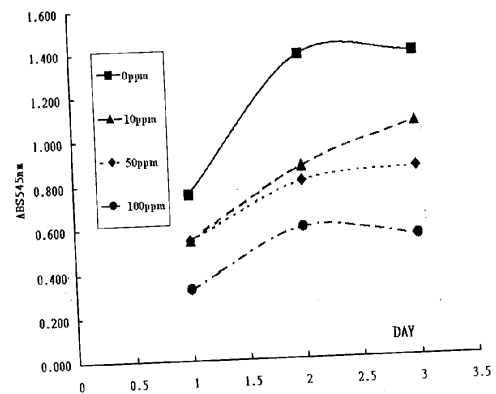
【図 4 a】



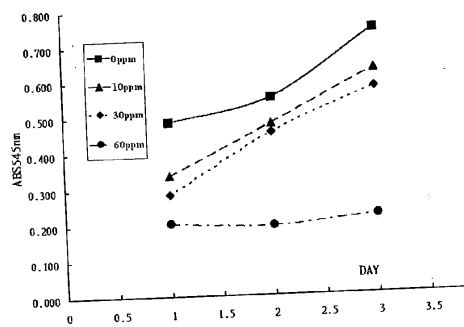
【図 4 b】



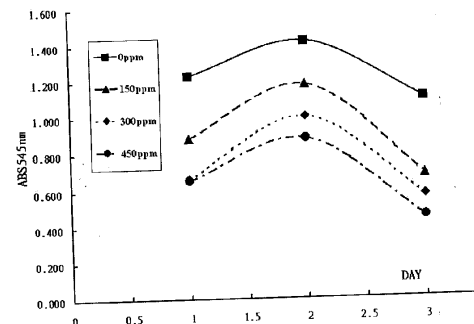
【図 4 d】



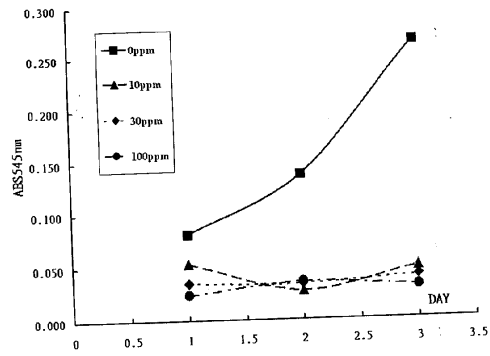
【図 4 c】



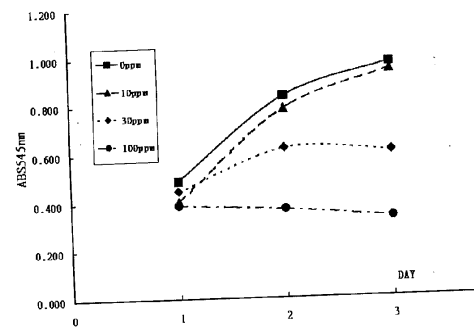
【図 5 a】



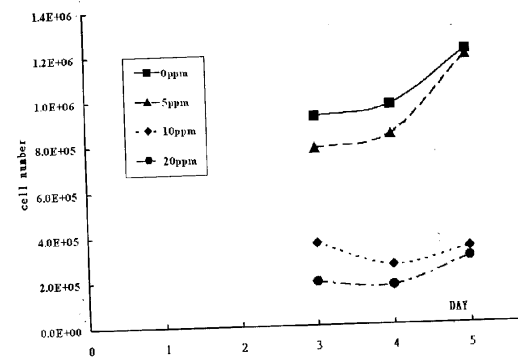
【図 5 b】



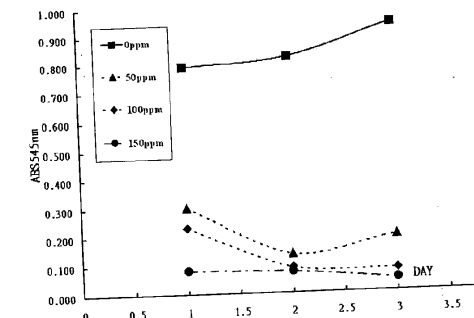
【図 6 a】



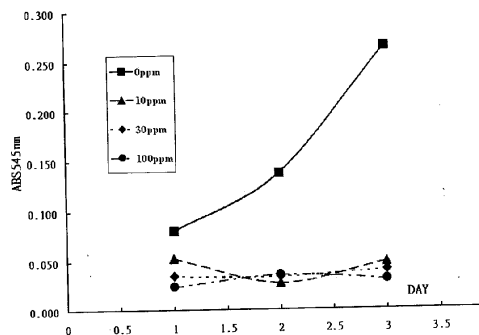
【図 5 c】



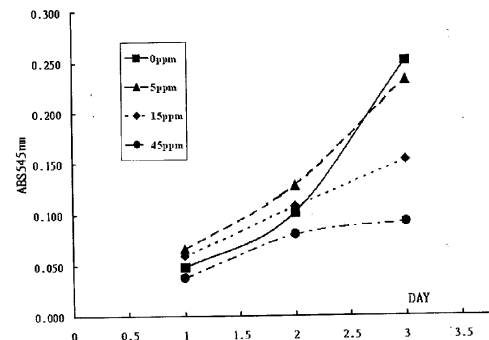
【図 6 b】



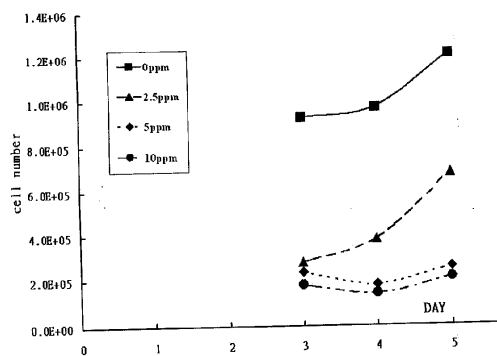
【図 6 c】



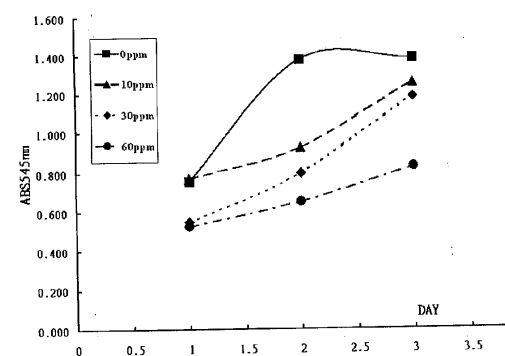
【図 6 e】



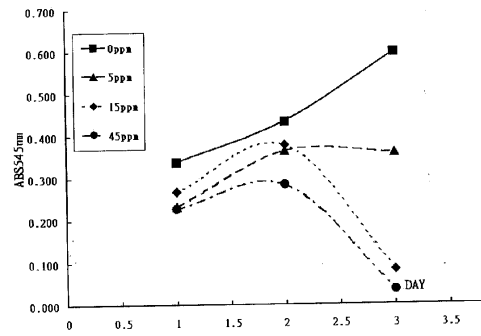
【図 6 d】



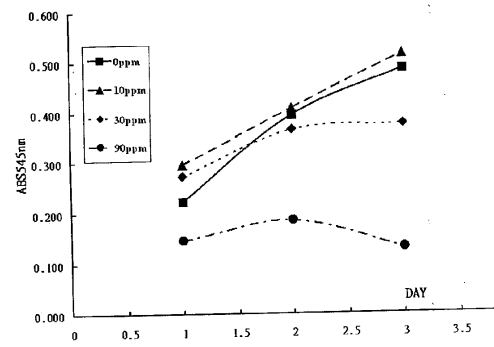
【図 6 f】



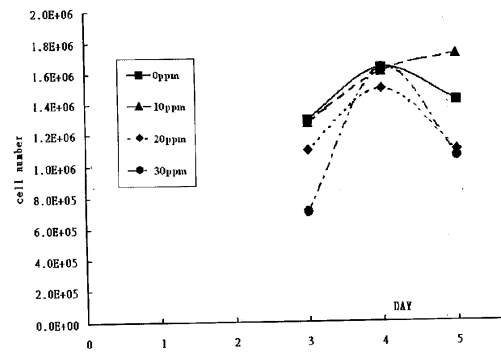
【図 7 a】



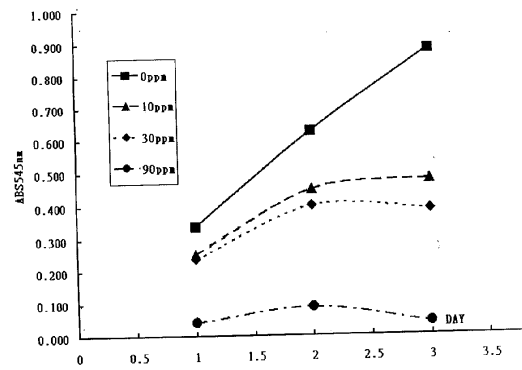
【図 7 c】



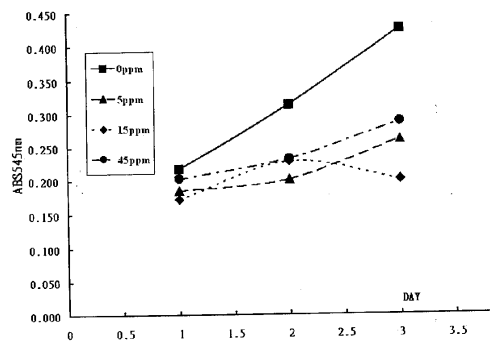
【図 7 b】



【図 7 d】



【図 7 e】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 9/12 (2006.01)		A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)		A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
C 0 7 D 207/46 (2006.01)		C 0 7 D 207/46	
C 0 7 D 307/60 (2006.01)		C 0 7 D 307/60	Z
C 1 2 N 1/14 (2006.01)		C 1 2 N 1/14	F

(72)発明者 許 嘉欽

台湾・タオユアン・カントリー・333・クエイ・シャン・シアン・ウェン・ミン・セカンド・ストリート・#1-1

合議体

審判長 内田 淳子

審判官 天野 貴子

審判官 前田 佳与子

(56)参考文献 特開昭52-156924(JP,A)

特公昭43-29950(JP,B2)

特開2003-289892(JP,A)

特開2001-231545(JP,A)

特開2003-81863(JP,A)

特開2003-192606(JP,A)

J.Nat.Prod.,(2004),67(1),p.46-8

Chemical Abstracts,vol.55,abs.no.22227h-22229c

J.Nat.Prod.,(1995),58(11),p.1655-61

Bot.Bull.Acad.Sin.,(1997),38,p.273-5

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C07D, A61K

CA,REGISTRY/STN