

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年9月14日 (14.09.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/095798 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/575 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) *A61P 35/04* (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/304555
- (22) 国際出願日: 2006年3月9日 (09.03.2006)
- (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2005-065119 2005年3月9日 (09.03.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サンスター株式会社 (SUNSTAR INC.) [JP/JP]; 〒5691195 大阪府高槻市朝日町3番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 今中 宏真 (IMANAKA, Hiromichi) [JP/JP]; 〒5691195 大阪府高槻市朝日町3-1 サンスター株式会社内 Osaka (JP). 石角 篤 (ISHIKADO, Atsushi) [JP/JP]; 〒5691195 大阪府高槻市朝日町3-1 サンスター株式会社内 Osaka (JP). 奥 直人 (OKU, Naoto) [JP/JP]; 〒4240857 静岡県静岡市清水区川原町21-11-302 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 三枝 英二, 外 (SAEGUSA, Eiji et al.); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜 T N K ビル Osaka (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
 — 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTICANCER COMPOSITION FOR ORAL USE COMPRISING LIPOSOME CONTAINING PHYTOSTEROLS AND PREVENTION OR TREATMENT FOR CANCER USING THE LIPOSOME

(54) 発明の名称: フィトステロールを含んだリポソームを含有する抗癌用経口組成物、該リポソームによる癌の予防又は治療

(57) Abstract: A novel use of a liposome containing phytosterols (β -sitosterol, campesterol, stigmasterol, brassicasterol, ergosterol, ergostadienol and so on). It is newly found out that a liposome containing phytosterols has an effect of inhibiting cancer metastasis. By orally administering a liposome containing phytosterols, cancer metastasis can be inhibited. Thus, it is highly useful in preventing or treating cancer.

(57) 要約: フィトステロール (β -シトステロール、カンペステロール、スティグマステロール、ブラシカステロール、エルゴステロール、エルゴスタディエノールなど) を含んだリポソームの新規な用途。フィトステロールを含んだリポソームが癌転移抑制作用を有することが新たに見出された。フィトステロールを含んだリポソームを経口投与することによって、癌転移が抑制され、癌の予防又は治療に有用である。

WO 2006/095798 A1

明 細 書

フィトステロールを含んだリポソームを含有する抗癌用経口組成物、該リポソームによる癌の予防又は治療

技術分野

[0001] 本発明は、フィトステロールを含んだリポソームを含有する、癌を抑制するための経口組成物、及び該リポソームによる癌の予防又は治療に関する。

背景技術

[0002] 近年、剤型修飾を施す方法の一つとして微粒子製剤を薬物キャリアーとして利用する研究が精力的になされている。そのような研究の一つとして、リポソームを経口投与の薬物キャリアーとして利用する検討がなされている。そして、リポソームは水溶性薬物をその内水層に、脂溶性薬物を脂質二重層へ取り込むことができるため、薬物のターゲティング、徐放化、副作用の軽減などを目的としたDDS製剤の薬物運搬体としてその応用が試みられている。また、リポソームは生体膜の成分から構成されているため生体に対する安全性が高いことも知られている。また、通常、経口投与では薬効をほとんど示さなかったインスリンを、修飾したリポソームに封入することによって、経口投与時のインスリンの薬効が向上することが認められている(非特許文献1~3)。また、エリスロポエチンをリポソームに封入することによりそのバイオアベイラビリティが上昇することも報告されている(非特許文献4)。しかしながら、これらの技術において、薬効はリポソームに内包される成分によるものであり、リポソームは単にキャリアーとして利用されているだけであった。したがって、リポソームそのものの薬効についてはあまり注目されていなかった。

[0003] また、ステロールは動植物細胞の構成成分の一つであり、動物植物に含まれるものを動物ステロール、植物細胞に含まれるものをフィトステロール(植物ステロールとも称される)という。コレステロールは動物ステロールの代表的な例であり、過剰に摂取すると健康に悪影響を与えることが知られている。一方、最近になって、フィトステロールについての研究が盛んになり、血漿コレステロール低下作用、大腸癌の発生を抑制する作用などが報告されている。

非特許文献1:Hirofumi Takeuchi et al. , "Enteral Absorption of Insulin in Rats from Mucoadhesive Chitosan-Coated Liposomes", Pharmaceutical Research, 13(6), 896-901, 1996

非特許文献2:Muramatsu K et al., "Dipalmitoylphosphatidylcholine Liposomes with Soybean-Derived Sterols and Cholesterol as a Carrier for the Oral Administration of Insulin in Rats", Biological & Pharmaceutical Bulletin, 19(8), 1055-1058, 1996

非特許文献3:Kazunori Iwanaga et al., " Application of surface-coated liposomes for oral delivery of peptide: Effects of coating the liposome's surface on the GI transit of insulin", Journal of Pharmaceutical Sciences, 88, 248-252, 1999

非特許文献4:Yoshie Maitani et al., " Oral administration of recombinant human erythropoietin in liposomes in rats: Influence of lipid composition and size of liposomes on bioavailability", Journal of Pharmaceutical Sciences, 85, 440-445, 1996

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0004] しかしながら、フィトステロールは水に不溶性又は難溶性であることから投与方法やキャリアーの開発が困難であった。そこで、本発明は、フィトステロールを含んだ癌を抑制する経口組成物、及び該リポソームによる癌の予防又は治療方法などの提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を行った結果、リポソーム膜構成成分としてフィトステロールを利用したリポソームが癌の転移を抑制する作用を有すること、特にレシチン及び β -シトステロールをリポソーム膜構成成分として含有するリポソームのその作用が強いことを見出した。したがって、本発明はフィトステロールを含んだリポソームの癌の予防又は治療の用途に関する。

[0006] 即ち、本発明は、下記の各項に係る組成物、予防又は治療方法及び使用を提供するものである。

項1. フィトステロールを含んだリポソームを含有する抗癌用経口組成物。

項2. フィトステロールが、 β -シトステロール、カンペステロール、スティグマステロー

ル、ブラシカステロール、エルゴステロール及びエルゴスタディエノールからなる群から選択される少なくとも1種である項1に記載の経口組成物。

項3. リポソームにおけるフィトステロール含有量が1～33重量%である項1に記載の経口組成物。

項4. 抗癌作用が癌転移抑制である項1～3のいずれかに記載の経口組成物。

項5. 経口組成物が食品組成物である項1～4のいずれかに記載の組成物。

項6. 経口組成物が医薬組成物である項1～4のいずれかに記載の経口組成物。

項7. フィトステロールを含んだリポソームの癌転移抑制に有効な量を対象者に経口投与することを特徴とする癌を予防又は治療する方法。

項8. フィトステロールが、 β -シトステロール、カンペステロール、ステイグマステロール、ブラシカステロール、エルゴステロール及びエルゴスタディエノールからなる群から選択される少なくとも1種である項7に記載の癌を予防又は治療する方法。

項9. 経口投与されるリポソームの量が、成人一人1日あたり、10mg～10000mgである項7又は8に記載の癌を予防又は治療する方法。

項10. 癌を予防又は治療するための、フィトステロールを含んだリポソームの使用。

項11. フィトステロールが、 β -シトステロール、カンペステロール、ステイグマステロール、ブラシカステロール、エルゴステロール及びエルゴスタディエノールからなる群から選択される少なくとも1種である項10に記載の使用。

[0007] 本発明の経口組成物は癌の転移を抑制する作用を有し、膜構成成分としてフィトステロールを含んだリポソームを有効成分として含有する。なお、本発明において、癌転移抑制とは、発生した癌が他の組織や器官に転移することを抑制することを包含する。また、本発明の癌を予防又は治療する方法は、フィトステロールを含んだリポソームの癌転移抑制に有効な量を対象者に経口投与することを特徴とする。さらに、本発明は、癌を予防又は治療するための、フィトステロールを含んだリポソームの使用に関する。ここで、癌の種類に制限はなく、例としては、頭頸部癌、胃癌、結腸癌、直腸癌、大腸癌、肝臓癌、胆のう・胆管癌、膵臓癌、肺癌、乳癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、口腔癌、咽頭癌、咽喉癌、舌癌、食道癌、腎癌、卵巣癌等が挙げられる。特に粘膜部位の癌に対して有効であり、大腸癌、口腔癌、舌癌、咽喉癌、肺癌、に対し

て高い効果が期待できる。

- [0008] リポソームはリン脂質を主体とした脂質を十分量の水で水和することにより形成される二分子膜を有する脂質小胞体である。現在、リポソームは脂質二重層の数に基づいて分類され、多重膜リポソーム(MLV)と一枚膜リポソームに分類される。一枚膜リポソームは、そのサイズに応じて、更にSUV (small unilamella vesicle)、LUV (large unilamella vesicle)、GUV (giant unilamella vesicle)に分類される。本発明のリポソームは、これらのいずれであってもよい。好ましいのはMLVである。本発明では、リポソームの大きさは、通常30～1000nm、好ましくは30～600nm、より好ましくは50～400nm、より一層好ましくは50～200nmである。
- [0009] リポソームは、従来の方法により製造することができる。例えば、所定量のレシチン及びステロールを、例えばエタノールなどの適当な有機溶媒で可溶化し、減圧下に溶媒を除去し、膜脂質を作成後、これに種々の緩衝液などを含む水溶液を添加して、例えば、1000～3000rpm程度で2～5分間程度攪拌して、リポソーム懸濁液を調製することにより得ることができる。
- [0010] 得られた懸濁液に対しては、必要に応じて、リポソーム外液中の生理活性物質を除去する操作、例えば懸濁液を濾過後得られた濾液を透析する操作を行ってもよい。
- [0011] 本発明では、ステロールとしてフィトステロールを使用する。フィトステロールは主として植物細胞の構成成分として存在することが知られている。フィトステロールとしては、 β -シトステロール、カンペステロール、スティグマステロール、ブラシカステロール、エルゴステロール、エルゴスタディエノールなどが例示され、1種単独又は2種以上組み合わせて使用することができる。好ましくは、 β -シトステロールである。リポソームにおけるフィトステロールの含有量は、通常1～33重量%、好ましくは10～33重量%、より好ましくは10～25重量%である。
- [0012] また、本発明では、レシチンとして、例えば、卵黄レシチン、大豆レシチン、ナタネレシチン、コーンレシチン、ひまわりレシチン、ピーナッツレシチンなどを1種単独で又は2種以上組み合わせて使用することができるがこれらに限定されない。本発明では、これらの水素添加物を用いることもできる。レシチンはホスファチジルコリン又は1, 2-ジアシルグリセロール 3-ホスホコリンとも称され、一般的に、グリセロールの1位及

び2位に脂肪酸が結合している。本発明では、上記例示のレシチンに加えて、1位及び2位の両方又は片方に炭素数12～24の不飽和脂肪酸が結合しているレシチンを使用することが好ましく、1位に炭素数12～24の飽和脂肪酸、2位に炭素数12～24の不飽和脂肪酸が結合しているレシチンを使用することが特に好ましい。ここで、飽和脂肪酸及び不飽和脂肪酸は直鎖状及び分枝状のいずれでもよい。このようなレシチンを使用することにより、リポソームに封入された生理活性物質の腸吸収性が向上する。好ましい不飽和脂肪酸としては、炭素数16～18の不飽和脂肪酸を使用でき、特に2位にオレイン酸、リノール酸が多く結合したレシチンを使用することにより、より腸吸収性の向上が期待できる。本発明では、卵黄レシチン、大豆レシチン、ひまわりレシチン、ナタネレシチンが好ましい。リポソームにおけるレシチンの含有量は、通常67～99重量%、好ましくは67～90重量%、より好ましくは75～90重量%である。

[0013] さらに、本発明では、リポソーム中のレシチンとフィトステロールのモル比は、50:50～90:10程度が好ましく、55:45～85:15がより好ましく、60:40～70:30が最も好ましい。モル比がこれらの範囲にあるとリポソーム膜の安定性が向上する。

[0014] レシチン又はステロールの含有量は既知の方法で測定できる。例えば、レシチンの含有量はFiske-Subbarow法など、ステロールの含有量はHPLC、比色法などによって定量できる。

[0015] さらに、リポソームの表面をコーティングすることができ、このコーティング物も有効成分として利用できる。好ましいコーティングとしては、硫酸基を含有する多糖類によるコーティングがあげられる。硫酸基含有多糖類としては、フコイダン、カラギーナン、寒天、ヘパリンなどが挙げられる。また、該硫酸基含有多糖類としては、硫酸基を含まない多糖を硫酸化したものも包含され、例えば、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸などであってもよい。

[0016] 硫酸基含有多糖類としては、分子量が5000～300000程度のものが好ましく用いられる。これらの硫酸基含有多糖類の中でもフコイダン及びカラギーナンを好ましく用いることができ、特にフコイダンが好ましい。

[0017] 硫酸基含有多糖類の使用量は、例えば、リポソームに含有されるレシチン100重量部に対して、10～500重量部程度が好ましく、20～200重量部程度がより好ましい。

- [0018] コーティングは、例えば、フィトステロールを含んだリポソームの懸濁液に、硫酸基含有多糖類を加え、1000～3000rpm程度で2～5分間程度攪拌することにより行うことができる。なお、1つのコーティング膜の中に複数のリポソームが含まれていてもよい。
- [0019] リポソームが硫酸基含有多糖類でコーティングされていることは、例えば、リポソーム溶液のゼータ電位が、硫酸基含有多糖類を添加して攪拌することにより変化することにより確認できる。
- [0020] リポソームにはレシチン、フィトステロール以外にも必要に応じて、 α -トコフェロール、アスコルビン酸などの抗酸化剤、乳酸、クエン酸などの有機酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミンなどの脂質、キトサン、フコイダン、ヒアルロン酸などの天然高分子、ポリエチレングリコール、カルボキシビニルポリマーなどの合成高分子、トレハロース、ラクチュロース、マルチトールなどの糖質、グリセリンなどのポリオール等を加えることができる。
- [0021] 本発明において利用されるリポソームには必要に応じて様々な物質を内容物として封入することができる。例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、シスプラチン、タキソールなどの薬効成分、 β -グルカン、多糖類などの制癌効果を有する成分などである。内容物を封入したリポソームは、従来の方法により製造することができる。例えば、所定量のレシチン及びフィトステロールを、例えばエタノールなどの適当な有機溶媒で可溶化し、減圧下に溶媒を除去し、膜脂質を作成後、これに内容物を含む水溶液を添加して、例えば、1000～3000rpm程度で2～5分間程度攪拌して、リポソーム懸濁液を調製することにより得ることができる。リポソームに包含される内容物の量は、リポソーム中の脂質に対して通常1～1000重量%、好ましくは10～500重量%である。
- [0022] 得られた懸濁液に対しては、必要に応じて、リポソーム外液中の内容物を除去する操作、例えば懸濁液を濾過後、得られた濾液を透析する操作を行ってもよい。
- [0023] 本発明の経口組成物を食品組成物として利用する場合には、リポソームを必要に応じてその食品の形態に応じた可食性担体、食品素材、食品添加物などと組み合わせ、通常の方法により調製することができる。食品の形態としては、飲料などの液状

の食品、錠剤、顆粒、チュアブルタブレットなどの固形の食品等として利用することができる。また、ヨーグルトなどの半固形の食品としても利用することができる。具体的な食品の形態としては、ジュース、清涼飲料水、ティー等の液体飲料；粉末ジュース、粉末スープ等の粉末飲料；チョコレート、キャンディー、チューインガム、アイスクリーム、ゼリー、クッキー、ビスケット、コーンフレーク、チュアブルタブレット、フィルムシート、ウエハース、グミ、煎餅、饅頭等の菓子類；ドレッシング、ソース等の調味料；パン類、麺類、こんにゃく、練り製品（かまぼこ等）、ふりかけ、口腔用スプレー、トローチ等が挙げられる。また、添加物として、乳酸菌などの生菌又は死菌、その他のプロバイオティクス素材、ビタミン、生薬、ハーブ等の植物そのものまたは抽出物を配合しても良い。

[0024] 食品組成物の担体として例えば、マルチトール、キシリトール、ソルビトール、エリスリトール等の糖アルコール類、結晶セルロース、乳糖、白糖、ブドウ糖、デンプン、炭酸塩類、リン酸塩類等の賦形剤、ゼラチン、アルギン酸、キサンタンガム、セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、カラギーナン、プルラン、ペクチン等の粘結剤、シヨ糖脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、酵素処理レシチン、酵素分解レシチン、サポニン等の乳化剤、アスコルビン酸、トコフェロール等の抗酸化剤、乳酸、クエン酸、グルコン酸、グルタミン酸等の酸味料、ビタミン類、アミノ酸類、乳酸塩、クエン酸塩、グルコン酸塩などの強化剤、二酸化ケイ素等の流動化剤、シヨ糖脂肪酸エステル、ステアリン酸塩類等の滑沢剤、ラクチュロース、ラフィノース、フルクトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、キシロオリゴ糖、大豆オリゴ糖等のオリゴ糖、難消化性デキストリン、サイリウム、ビートファイバー等の食物繊維、スクラロース、アセスルファムカリウム、アスパルテーム、グリシルリチン等の甘味料、ハッカ油、ユーカリ油、ケイヒ油、ウイキョウ油、チョウジ油、オレンジ油、レモン油、ローズ油、フルーツフレーバー、ミントフレーバー、ペパーミントパウダー、dl-メントール、l-メントール等の香料を使用することができる。また、添加物として、乳酸菌などの生菌又は死菌、その他のプロバイオティクス素材、プレバイオティクス素材、ビタミン、生薬、ハーブ等の植物そのものまたは抽出物を配合しても良い。

[0025] 本発明の経口食品組成物は、癌の転移を抑制する作用、癌の予防作用、癌の治

療作用などを有する健康食品、機能性食品、特定保健用食品、栄養機能食品、病者用食品等の用途に用いることができる。

- [0026] 本発明の経口食品組成物において経口食品組成物全量に対するリポソーム含有量は組成物の剤型等に応じて適宜設定されるが、通常0.5～95重量%、好ましくは0.8～80重量%、より好ましくは1～50重量%である。また、本発明の組成物が飲料の場合、リポソーム含有量のより一層好ましい範囲は1～4重量%である。
- [0027] また、本発明の経口組成物は、フィトステロールを含んだリポソーム及び必要に応じて薬学的に許容される担体を含むし、液剤、錠剤、顆粒剤、細粒剤、粉剤などの固形剤或いは当該液剤又は固形剤を封入したカプセル剤等の経口投与可能な医薬組成物として使用できる。薬学的に許容される担体としては、賦形剤、希釈剤等が挙げられる。また、経口医薬組成物は香料等の各種添加剤を含むこともできる。
- [0028] 担体及び添加剤としては、例えば、糖アルコール類(マルチトール、キシリトール、ソルビトール、エリスリトールなど)、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、デンプン、炭酸塩類(炭酸カルシウムなど)、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸、メチルセルロース、グリセリン、アルギン酸ナトリウム、アラビアゴム、タルク、リン酸塩類(リン酸一水素カルシウム、リン酸水素カルシウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸二カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸二水素カルシウム、リン酸二水素ナトリウムなど)、硫酸カルシウム、乳酸カルシウム、カカオ脂等の賦形剤、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルピロリドン、クロスポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシビニルポリマー、結晶セルロース、粉末セルロース、結晶セルロース・カルメロースナトリウム、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、エチルセルロース、リン酸カリウム、アラビアゴム末、プルラン、ペクチン、デキストリン、トウモロコシデンプン、アルファー化デンプン、ヒドロキシプロピルスターチ、ゼラチン、キサントガム、カラギーナン、トラガント、トラガント末、マクロゴール等の結合剤、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン

酸モノグリセリド、デンプン、乳糖等の崩壊剤、白糖、ステアリン酸、カカオバター、水素添加油等の崩壊抑制剤、第4級アンモニウム塩、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤、グリセリン、デンプン等の保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤、精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ポリエチレングリコール等の滑沢剤、シヨ糖脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、酵素処理レシチン、酵素分解レシチン、サポニン等の乳化剤、アスコルビン酸、トコフェロール等の抗酸化剤、乳酸、クエン酸、グルコン酸、グルタミン酸等の酸味料、ビタミン類、アミノ酸類、乳酸塩、クエン酸塩、グルコン酸塩などの強化剤、二酸化ケイ素等の流動化剤、スクラロース、アセスルファムカリウム、アスパルテーム、グリシルリチン等の甘味料、ハッカ油、ユーカリ油、ケイヒ油、ウイキョウ油、チョウジ油、オレンジ油、レモン油、ローズ油、フルーツフレーバー、ミントフレーバー、ペパーミントパウダー、dl-メントール、l-メントール等の香料等が挙げられる。

[0029] 更に錠剤等の固形剤には必要に応じ通常剤皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フィルムコーティング錠、二重錠、多層錠等とすることができる。また、硬質ゼラチンカプセル、軟質カプセル等にリポソームを充填してカプセル剤とすることもできる。

[0030] 液体剤は水性又は油性の懸濁液、溶液、シロップ、エリキシル剤であってもよく、通常剤担体、添加剤等を用いて常法に従い、調製することができる。

[0031] また、医薬組成物は抗癌剤、癌転移抑制剤、癌予防剤として用いることができる。

[0032] 本発明の経口医薬組成物において経口医薬組成物全量に対するリポソーム含有量は、組成物の剤型等に応じて適宜設定されるが、通常0.5～95重量%、好ましくは0.8～80重量%、より好ましくは1～50重量%である。また、本発明の組成物が液体剤の場合、リポソーム含有量のより一層好ましい範囲は1～4重量%である。

[0033] 本発明の経口組成物の摂取量は、成人一人1日あたり、摂取されるリポソームの重量が、通常10mg～10000mg、好ましくは20mg～2000mg、より好ましくは50mg～2000mgとなる量である。

発明の効果

[0034] フイトステロールを含んだリポソームは癌の転移を有意に抑制する効果を有する。

本発明は、癌の転移の抑制、癌の予防又は治療に有用である。本発明の経口組成物は、特に食品組成物、医薬組成物として有用である。

図面の簡単な説明

- [0035] [図1]NK活性の試験結果を示すグラフである。縦軸はNK活性(%)を示し、横軸はエフェクター細胞:ターゲット細胞の比(E/T比 50:1、25:1)を示し、●はコントロール群、▲はコレステロール群、■はフィトステロール群を示す。

発明を実施するための最良の形態

- [0036] 以下に実施例及び試験例を示して、本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例

- [0037] 実施例1

β-シトステロール及び卵黄レシチンを膜構成成分とするリポソームの調製

薄膜水和法によりリポソームを調製した。卵黄レシチンとβ-シトステロールのモル比が2:1となるように、クロロホルムで500mMの濃度に溶解した卵黄レシチンを160μl、250mMの濃度に溶解したβ-シトステロールを160μl量りとり、両溶液を混合し、クロロホルムを加えた。ロータリーエバポレーターにてクロロホルムを減圧下留去し、真空乾燥させて薄膜を作成した。この薄膜に卵黄レシチン濃度が20mMとなるようにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を4ml加え、ボルテックスミキサーで処理し、液体窒素による凍結融解を3回行うことによりリポソーム懸濁液を得た。この懸濁液をプローブ型ソニケーターで10分間処理し、リポソーム組成物を得た。

- [0038] 比較例1

コレステロール及び卵黄レシチンを膜構成成分とするリポソームの調製

β-シトステロールをコレステロールに代えた以外は実施例1と同様にしてリポソーム組成物を得た。

- [0039] 試験例1

リポソーム組成物によるB16BL6メラノーマ細胞の転移抑制作用

5週齢のC57BL6/Jマウス20匹を4群に分けた。コントロール群には1日1回0.2mLのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を飼育6日目まで強制的に経口投与した。同様に、リポ

ソーム化 β -シトステロール群にはPBSに代えて実施例1のリポソーム組成物を経口投与し、 β -シトステロール群にはPBSに代えてリポソーム化されていない通常の β -シトステロールの水懸濁液(リポソーム化 β -シトステロール群に投与されたリポソーム化 β -シトステロールと同重量の β -シトステロールを含有する)を経口投与し、リポソーム化コレステロール群にはPBSに代えて比較例1のリポソーム組成物を経口投与した。飼育7日目に無血清培地に懸濁したB16BL6メラノーマ細胞(3×10^4 個/0.2mL/匹)を静脈内投与した。飼育21日目にマウスを解剖して肺を摘出し、肺表面を観察してコロニーの数を数えた。各群マウスのコロニー数の平均値を表1に示す。

[0040] [表1]

	リポソーム化 β -シトステロール群	β -シトステロール群	リポソーム化 コレステロール群	コントロール群
平均 コロニー数 (個)	22	43	51	66

[0041] β -シトステロールを膜構成成分とするリポソームは、リポソーム化されていない β -シトステロール、コレステロールを膜構成成分とするリポソームと比較して腫瘍細胞の転移を有意に抑制した。これにより、フィトステロールを含んだリポソームが大腸癌、口腔癌、胃癌、咽頭癌、肺癌等の固形癌に対して有効であることが示された。したがって、フィトステロールを含んだリポソームは抗癌用経口組成物の有効成分として有用である。

[0042] 試験例2

リポソーム組成物によるNK細胞に対する作用

5週齢のC57BL6/Jマウス3匹を3群に分けた。コントロール群には1日1回0.2mLのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を飼育6日目まで強制的に経口投与した。同様に、フィトステロール群にはPBSに代えて実施例1のリポソーム組成物を投与し、コレステロール群にはPBSに代えて比較例1のリポソーム組成物を経口投与した。飼育7日目にマウスを解剖して無菌状態で脾臓を摘出し、単一の脾臓細胞懸濁液を作成した。YAC-1細胞(ターゲット細胞)を $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ で標識した($3.7\text{MBq}/10^6$ 個)。96ウェルタイタープレートに100 μ Lの標識されたYAC-1細胞(1×10^4 /well)を入れ、このウェルに脾臓細胞(エフェクター細胞、NK細胞)とYAC-1細胞の比(E/T比)が50:1、25:1とな

るように100 μ LのNK細胞を加えた(NK細胞添加ウェル)。また、NK細胞を加えないウェル(NK細胞非添加ウェル)も用意した。さらに、NK細胞添加ウェルと同じ細胞種、細胞量及び細胞比であるウェルにトリトンX-100を添加した(トリトン添加ウェル)。このプレート₂を5%CO₂ 雰囲気中37°Cで4時間インキュベートした後、200gで5分間遠心分離した。遠心分離により得られた上清において遊離された放射能をガンマカウンターで計測した。⁵¹Crの遊離比(NK活性)は下記の式で算出した。

[0043] [化1]

$$\text{遊離比 (\%)} = \frac{(\text{NK細胞添加ウェル計測値} - \text{NK細胞非添加ウェル計測値})}{(\text{トリトン添加ウェル計測値} - \text{NK細胞非添加ウェル計測値})} \times 100$$

[0044] なお、トリトン添加ウェル計測値は、ターゲット細胞(YAC-1細胞)及びエフェクター細胞(NK細胞)にトリトンX-100を添加することで得られた最大遊離値で、全ての癌細胞が破壊された時に遊離するCr標識の量であり、総癌細胞数に相当する。また、NK細胞添加ウェル計測値は、NK細胞を加えることで遊離したCr標識の量であり、NK細胞によって殺された癌細胞数に相当する。NK細胞非添加ウェル計測値は、コントロールであり、YAC-1細胞単独の状態₂で遊離したCr標識の量である。

[0045] 結果を図1に示す。コレステロール群はコントロール群より高いNK活性を示したが、フィトステロール群はそのコレステロール群よりさらに有意に高いNK活性を示した。

[0046] 処方例1:錠剤

卵黄レシチンとフィトステロールを用いてリポソームを調製し、該リポソームとその他の成分を用い、常法により下記の組成の錠剤を製造した。

[0047]

卵黄レシチン	4.0 重量%
フィトステロール	1.0 重量%
マルチトール	42.0 重量%
乳糖	25.0 重量%
ラクチュロース	20.0 重量%
シヨ糖脂肪酸エステル	8.0 重量%

処方例2:顆粒

卵黄レシチンとフィトステロールを用いてリポソームを調製し、該リポソームとその他の成分を用い、常法により下記の組成の顆粒を製造した。

[0048]

卵黄レシチン	5.0 重量%
フィトステロール	1.0 重量%
乳糖	41.3 重量%
デンプン	50.0 重量%
キサンタンガム	2.0 重量%
トコフェロール	0.1 重量%
グルコン酸	0.1 重量%
香料	0.5 重量%

処方例3:飲料

卵黄レシチンとフィトステロールを用いてリポソームを調製し、該リポソームとその他の成分を用い、常法により下記の組成の飲料を製造した。

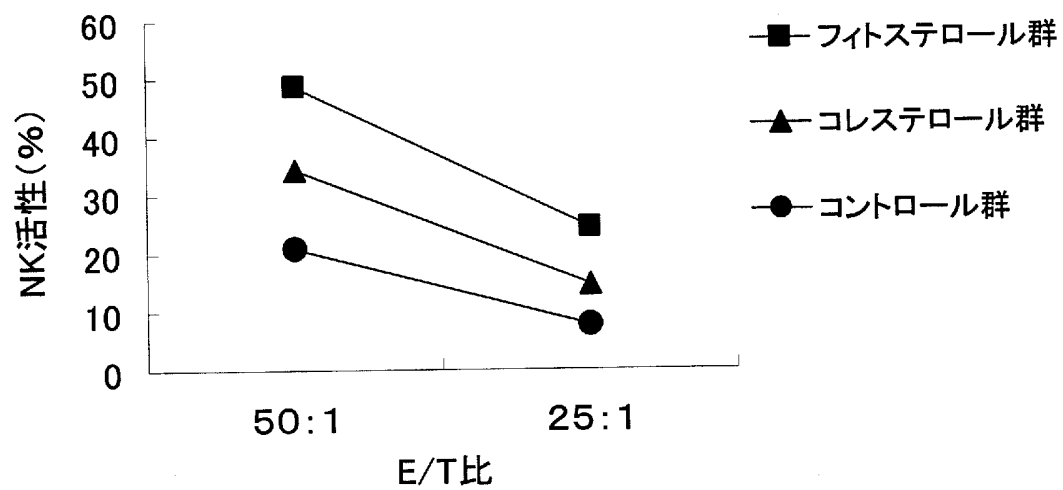
[0049]

卵黄レシチン	1.0 重量%
フィトステロール	0.2 重量%
クエン酸	0.5 重量%
クエン酸ナトリウム	0.5 重量%
果糖・ぶどう糖液糖	10.0 重量%
ビタミンC	0.5 重量%
香料	0.15 重量%
精製水	残部

請求の範囲

- [1] フィトステロールを含んだリポソームを含有する抗癌用経口組成物。
- [2] フィトステロールが、 β -シトステロール、カンペステロール、スティグマステロール、ブラシカステロール、エルゴステロール及びエルゴスタディエノールからなる群から選択される少なくとも1種である請求項1に記載の経口組成物。
- [3] リポソームにおけるフィトステロール含有量が1～33重量%である請求項1に記載の経口組成物。
- [4] 抗癌作用が癌転移抑制である請求項1～3のいずれかに記載の経口組成物。
- [5] 経口組成物が食品組成物である請求項1～4のいずれかに記載の組成物。
- [6] 経口組成物が医薬組成物である請求項1～4のいずれかに記載の経口組成物。
- [7] フィトステロールを含んだリポソームの癌転移抑制に有効な量を対象者に経口投与することを特徴とする癌を予防又は治療する方法。
- [8] フィトステロールが、 β -シトステロール、カンペステロール、スティグマステロール、ブラシカステロール、エルゴステロール及びエルゴスタディエノールからなる群から選択される少なくとも1種である請求項7に記載の癌を予防又は治療する方法。
- [9] 経口投与されるリポソームの量が、成人一人1日あたり、10mg～10000mgである請求項7又は8に記載の癌を予防又は治療する方法。
- [10] 癌を予防又は治療するための、フィトステロールを含んだリポソームの使用。
- [11] フィトステロールが、 β -シトステロール、カンペステロール、スティグマステロール、ブラシカステロール、エルゴステロール及びエルゴスタディエノールからなる群から選択される少なくとも1種である請求項10に記載の使用。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/304555

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K31/575 (2006.01), A61K9/127 (2006.01), A61K47/24 (2006.01), A61P35/00 (2006.01), A61P35/04 (2006.01), A23L1/30 (2006.01)		
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) A23L1/30, A61K9/127, A61K31/575, A61K47/24, A61P35/00, A61P35/04		
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 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), JMEDPLUS (JOIS), JST7580 (JOIS), JSTPLUS (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2003/37360 A1 (XU Rongxiang), 08 May, 2003 (08.05.03), Claims 1 to 102 & JP 2005-508976 A & EP 1439847 A1	1-6
Y	JP 2004-507492 A (Novartis Nutrition AG.), 11 March, 2004 (11.03.04), Claims 1 to 21 & WO 02/17892 A2 & EP 1315482 A2	1-6
Y	JP 2004-534793 A (Novartis Nutrition AG.), 18 November, 2004 (18.11.04), Claims 1 to 16 & WO 02/100412 A2 & EP 1399165 A2	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 04 April, 2006 (04.04.06)	Date of mailing of the international search report 11 April, 2006 (11.04.06)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/304555

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 2002-503209 A (Stanislaw R. Burzynski), 29 January, 2002 (29.01.02), Claims 1 to 14; page 4, lines 6 to 12 & WO 97/42939 A1 & EP 906088 A1	1-6
Y	JP 7-278016 A (Pola Chemical Industries Inc.), 24 October, 1995 (24.10.95), Claims 1 to 2; Par. No. [0001] (Family: none)	1-6
Y	Hisami KAWANO, "Kangan Chiryoyo Pirarubicin Honyu Kan Targeting Liposome Seizai no Kaihatsu", The Annual Report of the Hoshi College of Pharmacy, 2003, No.45, pages 23 to 29	1-6
A	JP 4-501858 A (Marigen S.A.), 02 April, 1992 (02.04.92), Full text & WO 91/01139 A1 & EP 436682 A1	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/304555

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 7 - 11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 7 to 11 are relevant to methods for treatment of the human body by surgery or therapy and diagnostic methods.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K31/575 (2006.01), A61K9/127 (2006.01), A61K47/24 (2006.01), A61P35/00 (2006.01), A61P35/04 (2006.01), A23L1/30 (2006.01)</p>												
<p>B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A23L 1/30, A61K 9/127, A61K 31/575, A61K 47/24, A61P 35/00, A61P 35/04</p>												
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2006年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2006年	日本国実用新案登録公報	1996-2006年	日本国登録実用新案公報	1994-2006年		
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2006年											
日本国実用新案登録公報	1996-2006年											
日本国登録実用新案公報	1994-2006年											
<p>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) BIOSIS (STN), Caplus (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), JMEDPlus (JOIS), JST7580 (JOIS), JSTPlus (JOIS)</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2003/37360 A1 (XU Rongxiang) 2003.05.08, 請求項 1-102 & JP 2005-508976 A & EP 1439847 A1</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2004-507492 A (ノバルティス・ニュートリション・アクチエン ゲゼルシャフト) 2004.03.11, 請求項 1-21 & WO 02/17892 A2 & EP 1315482 A2</td> <td>1-6</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	Y	WO 2003/37360 A1 (XU Rongxiang) 2003.05.08, 請求項 1-102 & JP 2005-508976 A & EP 1439847 A1	1-6	Y	JP 2004-507492 A (ノバルティス・ニュートリション・アクチエン ゲゼルシャフト) 2004.03.11, 請求項 1-21 & WO 02/17892 A2 & EP 1315482 A2	1-6	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号										
Y	WO 2003/37360 A1 (XU Rongxiang) 2003.05.08, 請求項 1-102 & JP 2005-508976 A & EP 1439847 A1	1-6										
Y	JP 2004-507492 A (ノバルティス・ニュートリション・アクチエン ゲゼルシャフト) 2004.03.11, 請求項 1-21 & WO 02/17892 A2 & EP 1315482 A2	1-6										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table border="0"> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			「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	「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	「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	「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	「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)	「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	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
「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	「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											
「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	「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											
「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)	「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											
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献											
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願												
<p>国際調査を完了した日 04.04.2006</p>	<p>国際調査報告の発送日 11.04.2006</p>											
<p>国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員) 長部 喜幸 電話番号 03-3581-1101 内線 3452</p>	<table border="1"> <tr> <td>4C</td> <td>3229</td> </tr> </table>	4C	3229								
4C	3229											

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2004-534793 A (ノバルテイス・ニュートリション・アクチエン ゲゼルシャフト) 2004. 11. 18, 請求項 1 - 1 6 & WO 02/100412 A2 & EP 1399165 A2	1 - 6
Y	JP 2002-503209 A (スタニスロー、アール、バージンスキー) 2002. 01. 29, 請求項 1 - 1 4、第 4 頁第 6 ~ 1 2 行 & WO 97/42939 A1 & EP 906088 A1	1 - 6
Y	JP 7-278016 A (ポーラ化成工業株式会社) 1995. 10. 24, 請求項 1 - 2、【0 0 0 1】 (ファミリーなし)	1 - 6
Y	川野 久美, 肝がん治療用ピラルビシン封入肝ターゲットイングリボ ソーム製剤の開発, 星薬科大学紀要, 2003, No. 45, Pages 23-29	1 - 6
A	JP 4-501858 A (マリゲン ソシエテ アノニム) 1992. 04. 02, 全文 & WO 91/01139 A1 & EP 436682 A1	1 - 6

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 7-11 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 7-11 は、人の身体の手術又は治療による処置及び診断方法に該当するものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。