

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-155392

(P2015-155392A)

(43) 公開日 平成27年8月27日(2015.8.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 33/42 (2006.01)	A 6 1 K 33/42	4 C 0 7 6
A 6 1 K 31/7004 (2006.01)	A 6 1 K 31/7004	4 C 0 8 4
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/10	4 C 0 8 6
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-31056 (P2014-31056)
 (22) 出願日 平成26年2月20日 (2014.2.20)

(71) 出願人 514043908
 中西 弘幸
 大阪府堺市堺区熊野町東4丁4-19 中
 西胃腸外科
 (74) 代理人 100156845
 弁理士 山田 威一郎
 (74) 代理人 100124431
 弁理士 田中 順也
 (74) 代理人 100174160
 弁理士 水谷 馨也
 (74) 代理人 100124039
 弁理士 立花 顕治
 (74) 代理人 100112896
 弁理士 松井 宏記

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グルコースと炭酸アパタイトを使用した抗癌剤

(57) 【要約】

【課題】本発明の目的は、優れた抗腫瘍効果を奏することができる抗癌剤を提供することである。

【解決手段】炭酸アパタイトの粒子にグルコースを含有させることによって、優れた抗腫瘍効果を奏することが可能になる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

グルコースを含有する炭酸アパタイトを有効成分とすることを特徴とする、抗癌剤。

【請求項 2】

グルコースを含有する炭酸アパタイトが、平均粒径 50 nm 以下のナノ粒子である、請求項 1 に記載の抗癌剤。

【請求項 3】

グルコースを含有する炭酸アパタイトが、薬学的に許容される溶媒に分散されている分散液状である、請求項 1 又は 2 に記載の抗癌剤。

【請求項 4】

更にアルブミンを含有する、請求項 3 に記載の抗癌剤。

【請求項 5】

固形癌に対して適用される、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗癌剤。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、抗癌剤に関する。より詳細には、本発明は、グルコースと炭酸アパタイトを使用した抗癌剤に関する。

【背景技術】**【0002】**

近年、癌の治療薬や治療法の進歩によって癌患者の生存率が上昇傾向にあるが、依然として、癌は我が国において死因の第 1 位を占めており、現在でも、年間 30 万人以上の国民が癌で亡くなっている。

【0003】

癌の治療法は、手術療法、放射線療法、化学療法に大別される。これらの内、化学療法は、癌患者に抗癌剤を投与する療法であり、手術療法や放射線療法の前後に、その病巣を根絶して治癒力を向上させる術前・術後の補助化学療法や、手術療法や放射線療法では治療できない全身に転移した癌の治療に利用されている。従来、代謝拮抗剤、アルキル化薬、白金製剤、トポイソメラーゼ阻害剤、分子標的薬、抗腫瘍性抗生物質等の各種抗癌剤が臨床的に実用化されており、幾つかの癌については、治癒が期待されるまでに至っている。

【0004】

しかしながら、従来 of 抗癌剤は、一定の治療効果が認められているものの、治療効果が不十分である、症例によって効果にバラツキが認められる、深刻な副作用を伴うことがある、等の問題点があり、化学療法による治療効果に限界があることも事実である。そのため、新しいタイプの抗癌剤の開発が求められている。

【0005】

また、従来、腫瘍に対して選択的に薬物を送達するためにリポソーム等のキャリアーに薬物を内包する等のドラッグデリバリーシステムが開発されており、抗癌剤の腫瘍への集積能を向上させることも可能である。しかしながら、ドラッグデリバリーシステムに使用されるキャリアーを使用する場合には、抗癌剤の製剤化が煩雑になるという欠点があり、また、肝臓や腎臓などの正常組織への集積を防ぐことは難しい。

【0006】

更に、腫瘍組織の間質液圧は正常組織に比べて高いことが知られており、腫瘍組織において間質液圧が高いことが、薬剤が腫瘍深部に浸透できず、十分な抗腫瘍効果を発揮できない大きな原因の 1 つと考えられている。そのため、抗癌剤による抗癌作用を効果的に発揮させるには、腫瘍組織の間質液圧を低下させ、効率的に腫瘍組織に集積させて、腫瘍組織の深部にまで浸透させる薬剤を開発することが有効になる。

【先行技術文献】**【特許文献】**

10

20

30

40

50

【 0 0 0 7 】

【特許文献 1】特開2011-144190号公報

【特許文献 2】特開2011-102255号公報

【特許文献 3】特開2009-242378号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

本発明は、優れた抗腫瘍効果を奏することができる抗癌剤を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

10

【 0 0 0 9 】

本発明者等は、前記課題を解決すべく鋭意検討を行ったところ、驚くべきことに、グルコースを含有する炭酸アパタイトには、優れた抗腫瘍効果を奏し得ることを見出した。更に、本発明者等は、炭酸アパタイトには、腫瘍組織の間質液圧を低下させる作用があることも見出した。本発明は、かかる知見に基づいて更に検討を重ねることにより完成したものである。

【 0 0 1 0 】

即ち、本発明は、下記に掲げる態様の発明を提供する。

項 1 . グルコースを含有する炭酸アパタイトを有効成分とすることを特徴とする、抗癌剤。

20

項 2 . グルコースを含有する炭酸アパタイトが、平均粒径 5 0 n m 以下のナノ粒子である、項 1 に記載の抗癌剤。

項 3 . グルコースを含有する炭酸アパタイトが、薬学的に許容される溶媒に分散されている分散液状である、項 1 又は 2 に記載の抗癌剤。

項 4 . 更にアルブミンを含有する、項 3 に記載の抗癌剤。

項 5 . 固形癌に対して適用される、項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗癌剤。

【発明の効果】

【 0 0 1 1 】

従来、グルコース及び炭酸アパタイトはそれぞれ単独では抗腫瘍効果が知られていないにも拘わらず、グルコースを含む炭酸アパタイトには格段に優れた抗腫瘍効果があることが見出されており、グルコースを含む炭酸アパタイトは、従来にない全く新しいタイプの抗癌剤として有用である。

30

【 0 0 1 2 】

腫瘍組織の間質液圧は正常組織に比べて高く、このことが薬剤が腫瘍深部に浸透し難くなっている大きな原因の 1 つとされている。一方、後述する参考例 1 に示すように、炭酸アパタイトには腫瘍組織の間質液圧を低下させる作用があることが見出されている。この腫瘍組織の間質液圧の低下によって、グルコースを含む炭酸アパタイトが腫瘍組織の深部まで浸透して腫瘍細胞内に効率的に取り込まれ、腫瘍細胞に対してグルコース及び / 又は炭酸アパタイトが何らかの作用を発揮することが、本発明の抗癌剤が優れた抗腫瘍効果を奏する一因になっていると考えられる。勿論、本発明は、前記作用機序に限定して解釈されるものではない。

40

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 3 】

【図 1】グルコースを含有する炭酸アパタイトを製造する際に使用したグルコース溶液中のグルコース量（横軸）と、製造された炭酸アパタイト粒子に内包されているグルコース量（縦軸）の関係を示す。

【図 2】実施例 1 において、グルコースを含有する炭酸アパタイトのヒト大腸癌細胞株（HT29 株）に対する抗腫瘍効果を測定した結果を示す。

【図 3】実施例 2 において、グルコースを含有する炭酸アパタイトのヒト大腸癌細胞株（HT29 株）に対する抗腫瘍効果を測定した結果を示す。

50

【図4】実施例3において、グルコースを含有する炭酸アパタイトを腫瘍モデルマウスに投与した後に、腫瘍サイズを観察した結果を示す。

【図5】実施例3において、グルコースを含有する炭酸アパタイトを腫瘍モデルマウスに投与した後に、腫瘍重量を測定した結果を示す。

【図6】実施例3において、グルコースを含有する炭酸アパタイトを腫瘍モデルマウスに投与した後に、摘出した腫瘍を観察した結果を示す。

【図7】実施例3において、グルコースを含有する炭酸アパタイトを腫瘍モデルマウスに投与した後に、腫瘍を摘出してHE染色した結果を示す。

【図8】実施例4において、グルコースを含有する炭酸アパタイトを腫瘍モデルマウスに投与した後に、腫瘍サイズを観察した結果を示す。

【図9】実施例5において、グルコースを含有する炭酸アパタイトを腫瘍モデルマウスに投与した後に、腫瘍に取り込まれたグルコース量を測定した結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明の抗癌剤は、グルコースを含有する炭酸アパタイト（以下、「グルコース含有炭酸アパタイト」と表記することもある）を有効成分とすることを特徴とする。以下、本発明の増強剤について詳述する。

【0015】

本発明で使用される「炭酸アパタイト」の組成自体は公知である。炭酸アパタイトは、水酸アパタイト($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)の水酸基(OH^-)の一部を炭酸基(CO_3^{2-})にて置換した化学構造を有し、一般式 $\text{Ca}_{10-m}\text{X}_m(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)_{1-n}\text{Y}_n$ で表すことができる。ここで、Xは、炭酸アパタイトにおけるCaを部分的に置換しうる元素であればよく、例えば、Sr、Mn、希土類元素等を挙げることができる。mは、通常0以上1以下の正数であり、好ましくは0以上0.1以下であり、より好ましくは0以上0.01以下であり、更に好ましくは0以上0.001以下である。Yは、炭酸アパタイトにおける CO_3 を部分的に置換しうる単位であり、OH、F、Cl等を例示することができる。nは、通常0以上0.1以下の正数であり、好ましくは0以上0.01以下であり、より好ましくは0以上0.001以下であり、更に好ましくは0以上0.0001以下である。

【0016】

また、本発明で使用されるグルコース含有炭酸アパタイトは、生体内に投与され、腫瘍組織に作用して抗腫瘍効果を奏する上で、平均粒径が50nm以下のナノ粒子であることが好ましい。グルコース含有炭酸アパタイトの平均粒径の下限値は、上述する所期の効果が得られる限り特に制限されないが、例えば、1nm以上、好ましくは3nm以上、より好ましくは5nm以上である。一方、グルコース含有炭酸アパタイトの平均粒径の上限は、より好ましくは40nm以下であり、更に好ましくは30nm以下、より更に好ましくは20nm以下、一層好ましくは10nm以下である。

【0017】

前記グルコース含有炭酸アパタイトの平均粒径は、後述する製造例に示すように、走査型プローブ顕微鏡を用いて観察することにより測定される。尚、平均粒径を測定するに際して、測定部位をCCDカメラで確認し、明らかに走査型プローブ顕微鏡を用いた測定に適さない巨大な粒子（例えば、粒径 $5\mu\text{m}$ 以上）が存在する場合は、それらは測定対象範囲から除去される。本書において、粒径とは、走査型プローブ顕微鏡で測定した際に、別個の粒子として認識可能な独立した粒子の粒径を意味する。よって、複数の粒子が凝集している場合は、それらの集合体を一つの粒子と判断する。

【0018】

グルコース含有炭酸アパタイトは、炭酸アパタイトの粒子の内部及び/又は表面においてグルコースが担持されている形態であればよい。また、グルコース含有炭酸アパタイトにおける炭酸アパタイトとグルコースの比率については、特に限定されないが、例えば、炭酸アパタイト100重量部当たり、グルコースが1~100重量部、好ましくは10~80重量部、更に好ましくは20~40重量部が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0019】

グルコース含有炭酸アパタイトの製造方法については、特に制限されないが、一例として、炭酸アパタイトを構成する成分の供給源とグルコースとを水溶液中でインキュベートする方法が挙げられる。より具体的には、カルシウムイオン、リン酸イオン、炭酸水素イオン、及びグルコースを含有する水溶液を調製してインキュベートすることによって、グルコース含有炭酸アパタイトを製造することができる。当該水溶液中の各イオン及びグルコースの濃度については、グルコース含有炭酸アパタイトが形成される限り特に制限されないが、下記を参考に適宜設定することができる。

【0020】

水溶液中のカルシウムイオン濃度としては、通常0.1mM以上であり、好ましくは0.5mM以上であり、より好ましくは1mM以上が挙げられる。カルシウムイオン濃度の上限は、通常1M以下であり、好ましくは100mM以下であり、より好ましくは10mM以下が挙げられる。

10

【0021】

水溶液中のリン酸イオン濃度としては、通常0.1mM以上であり、好ましくは0.5mM以上であり、より好ましくは1mM以上が挙げられる。リン酸イオン濃度の上限は、通常1M以下であり、好ましくは100mM以下であり、より好ましくは10mM以下が挙げられる。

【0022】

水溶液中の炭酸水素イオン濃度としては、通常1.0mM以上であり、好ましくは5mM以上であり、より好ましくは10mM以上が挙げられる。炭酸水素イオン濃度の上限は通常10M以下であり、好ましくは1M以下であり、より好ましくは100mM以下が挙げられる。

20

【0023】

カルシウムイオン、リン酸イオン及び炭酸水素イオンの供給源は、水溶液中にこれらのイオンを供給可能である限り特に制限されないが、例えば、これらのイオンの塩を水溶液に添加することができる。具体的には、カルシウムイオン源としてCaCl₂を用いることができ、リン酸イオン源としてNaH₂PO₄・2H₂Oを用いることができ、炭酸イオン源としてNaHCO₃を用いることができる。

【0024】

水溶液中のグルコース濃度については、炭酸アパタイト内に含有させるグルコース量に応じて適宜設定すればよいが、通常10 W/V%以上であり、好ましくは25 W/V%以上であり、より好ましくは50 W/V%以上が挙げられる。グルコース濃度の上限は通常90 W/V%以下であり、好ましくは80 W/V%以下であり、より好ましくは75 W/V%以下が挙げられる。

30

【0025】

各イオン供給源及びグルコースの混合順序は特に限定されず、炭酸アパタイト粒子が得られる限り、いかなる混合順序で水溶液を調製してもよい。例えば、先ず、グルコースを含有する第1の溶液を調製し、この第1の溶液に対して、カルシウムイオン、リン酸イオン及び炭酸水素イオンの各供給源を添加することにより、各イオン供給源及びグルコースを含む水溶液を調製することができる。また、例えば、グルコースを含有する第1の溶液、カルシウムイオンを含有する第2の溶液、並びにリン酸イオン及び炭酸水素イオンを含有する第3の溶液を調製し、第1の溶液と第2の溶液とを混合した後に、第3の溶液を更に添加することによっても、各イオン供給源及びグルコースを含む水溶液を調製することができる。勿論、これらの混合順、準備する溶液の組成については、グルコース含有炭酸アパタイトが調製されることを限度として特に制限されない。

40

【0026】

グルコース含有炭酸アパタイトを作製するための水溶液は、その目的を損なわない範囲で、上述する各イオン供給源及びグルコース以外の成分を含んでもよい。例えば、水溶液中に、フッ素イオン、塩素イオン、Sr、Mn等を添加することにより、炭酸アパタイトにおけるCaまたはCO₃を部分的に置換してもよい。但し、フッ素イオン、塩素イオン、Sr、Mnの添加量は、形成されるグルコース含有炭酸アパタイトのpH溶解性、粒径範囲に著しい影響を与えない範囲内とすることが好ましい。また、グルコース含有炭酸アパタイトを作製するための水溶液は、細胞培養用の各種培地やバッファーを利用して調製することもでき

50

る。

【0027】

グルコース含有炭酸アパタイトは、上記の各イオン及びグルコースを含有する水溶液のpHを6.0~9.0の範囲に調整し、一定時間放置（インキュベート）することによって得ることができる。グルコース含有炭酸アパタイトを形成する際の当該水溶液のpHとしては、例えば7.0~8.5、好ましくは7.1~8.5、更に好ましくは7.2~8.5、より更に好ましくは7.3~8.5、特に好ましくは7.4~8.5、最も好ましくは7.5~8.0が挙げられる。

【0028】

グルコース含有炭酸アパタイトを形成する際の当該水溶液の温度条件は、グルコース含有炭酸アパタイトの粒子が形成される限り特に制限されないが、通常10 以上であり、好ましくは25~80 、更に好ましくは37~70 以上が挙げられる。

10

【0029】

グルコース含有炭酸アパタイトを形成するための当該水溶液のインキュベート時間は、グルコース含有炭酸アパタイトの粒子が形成される限り特に制限されないが、通常1分~4時間、好ましくは10分~1時間が挙げられる。粒子形成の有無は、例えば、顕微鏡下で観察することによって確認することができる。

【0030】

また、上述の通り、グルコース含有炭酸アパタイトは、各種のイオン供給源となる物質とグルコースを、水、培地、又はバッファー等の溶媒に溶解させてインキュベートすることによって得られるが、そのようにして得られるグルコース含有炭酸アパタイトの分散液は、浸透圧、緩衝能、無菌性等の観点から必ずしも生体への投与（血管内投与）に適していない。よって、グルコース含有炭酸アパタイトが分散した溶媒を生体への投与に適した溶媒（例えば、生理食塩水）に置換するためには、通常、遠沈によって当該グルコース含有炭酸アパタイトを溶媒から分離し、回収して溶媒を置き換える操作が必要である。しかしながら、このような操作を行うとグルコース含有炭酸アパタイトの粒子同士が凝集し、粒子が巨大化するため、却って生体への投与には適さない状態へと変化してしまう。そこで、凝集したグルコース含有炭酸アパタイトの分散液を生体への投与に適した薬学的に許容される溶媒に置換した上で、後述する微細化処理を行うことにより、所望の平均粒径を備えるグルコース含有炭酸アパタイトを、薬学的に許容される溶媒中に分散させた状態で得ることができる。

20

30

【0031】

グルコース含有炭酸アパタイトの平均粒径を50nm以下に微細化する方法としては、好ましくは超音波振動処理が挙げられる。ここで、超音波振動処理とは、いわゆる菌体破碎等に用いられる超音波破碎機やホモジナイザー等の超音波振動子を直接試料に接触させて超音波をかける処理ではなく、一般に精密機器や試験管等の洗浄に用いられる超音波振動子と洗浄槽とが一体となった超音波洗浄器を用いた処理である。超音波洗浄器の洗浄槽（水槽）に液体（例えば、水）を入れ、そこに、グルコース含有炭酸アパタイトを薬学的に許容される溶媒中に分散させた分散液を収容した容器（例えば、プラスチック製のチューブ）を浮かべ、精密機器を洗浄する要領で液体を介して当該分散液に超音波をかける処理を意味する。これによって、簡便且つ効率的にグルコース含有炭酸アパタイトを微細化することができる。

40

【0032】

超音波振動処理に使用可能な装置は、上記超音波洗浄器のように、水などの溶媒を介して間接的にグルコース含有炭酸アパタイトを収容した容器に超音波振動を与えることが可能であるものであれば特に制限されない。汎用性及び取り扱い性の良さという観点から、超音波振動子及び恒温槽を備えた超音波洗浄器を用いることが好ましい。

【0033】

上記の超音波振動処理の条件は、所望の平均粒径に制御可能である限り特に制限されない。例えば、水槽の温度は、5~45 の温度から適宜選択することができるが、好ましくは10~35 であり、より好ましくは20~30 である。超音波振動処理の高周波出力は、例えば

50

、10～500Wの範囲で適宜設定することができ、好ましくは20～400W、より好ましくは30～300Wであり、更に好ましくは40～100Wである。発振周波数は、通常10～60Hzであり、好ましくは20～50Hzであり、より好ましくは30～40Hzである。超音波振動処理期間は、例えば、30秒～30分であり、好ましくは1～20分、より好ましくは3～10分の範囲で適宜設定することができる。

【0034】

超音波振動処理を行う際に用いる、グルコース含有炭酸アパタイトを含む分散液を収容する容器の種類は、グルコース含有炭酸アパタイトの平均粒径を所望の範囲に微細化することが可能である限り制限されず、分散液の容量や使用目的に応じて適宜選択することができる。例えば、1～1000ml容量のプラスチック製チューブを用いることができる。

10

【0035】

また、超音波振動処理は、グルコース含有炭酸アパタイトを含む分散液にアルブミンを添加して行ってもよい。これは、アルブミンとグルコース含有炭酸アパタイトとが共存する環境で超音波振動処理を行うことにより、より微細な粒径を有するグルコース含有炭酸アパタイトが得られ、粒子の再凝集を抑制することも可能となるためである。また、アルブミンが含まれていると、微細化されたグルコース含有炭酸アパタイトの再凝集を抑制することもできる。グルコース含有炭酸アパタイトを含む分散液にアルブミンを添加する場合、そのアルブミンの添加量については、特に制限されないが、前記グルコース含有炭酸アパタイトの微細化及び/又は再凝集抑制の観点から、例えば、0.1～500mg/ml、好ましくは1～100mg/ml、より好ましくは1～10mg/mlが挙げられる。このように、グルコース含有炭酸アパタイトを微細化するために添加されたアルブミンは、グルコース含有炭酸アパタイトと共生体内に投与してもよい。

20

【0036】

本発明の抗癌剤において、前記グルコース含有炭酸アパタイトの濃度については、特に制限されず、投与方法、製剤形態等を勘案して後述する投与量を充足できるように適宜設定すればよい。例えば、本発明の抗癌剤が分散液の場合であれば、前記グルコース含有炭酸アパタイトの濃度として、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{12}$ 個/ml、好ましくは $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{11}$ 個/ml、より $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 個/ml、更に好ましくは $3 \times 10^9 \sim 3 \times 10^{10}$ 個/ml、より更に好ましくは $6 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^{10}$ 個/mlが挙げられる。

30

【0037】

また、本発明の増強剤が分散液の場合、前記グルコース含有炭酸アパタイトを分散させる分散媒としては、薬学的に許容され、且つグルコース含有炭酸アパタイトを分散できるものであることを限度として特に制限されないが、具体的には、生理食塩水、その他緩衝溶液が挙げられる。

【0038】

また、本発明の増強剤において治療対象となる癌種については、化学療法の対象となる癌であることを限度として特に制限されないが、具体的には、大腸癌、結腸癌、胃癌、直腸癌、肝癌、膵癌、肺癌、乳癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮頸癌、頭頸部癌、胆管癌、胆嚢癌、口腔癌等の固形癌；白血病、悪性リンパ腫等の血液癌が挙げられる。これらの中でも、固形癌は、本発明の増強剤における治療対象として好適である。

40

【0039】

本発明の抗癌剤の投与方法については、特に制限されず、全身投与であっても、また局所投与であってもよい。本発明の抗癌剤は、全身投与により投与しても、腫瘍組織に対して特異的に蓄積させるという卓越した効果があるので、好ましい投与方法として全身投与が挙げられる。全身投与としては、具体的には、血管内（動脈内又は静脈内）投与、皮下投与、皮下投与、腹膜内投与等が挙げられ、好ましくは血管内投与、更に好ましくは動静脈内投与である。なお、血管内投与には、血管内注射のみならず、持続点滴も含まれる。

【0040】

本発明の抗癌剤の投与量については、癌種、患者の性別、年齢、症状などに応じて適宜決定されるため、一概に決定することはできないが、例えば、炭酸アパタイト量換算で1

50

回あたり10mg～1g/kg（体重）程度であればよい。

【0041】

また、本発明の抗癌剤は、投与前にグルコース含有炭酸アパタイトが凝集することを回避するという観点から、超音波振動処理後速やかに投与することが好ましい。例えば、超音波振動処理後1分以内、好ましくは30秒以内の投与が好ましい。但し、上述するように、アルブミンを添加することによってグルコース含有炭酸アパタイトの粒子の凝集を抑制する場合は、超音波振動処理後、数分～数十分経過後に投与することも可能である。

【0042】

また、本発明に抗癌剤は、本発明の効果を損なわないことを限度として、他の抗癌剤と共に製剤化されていてもよく、また他の抗癌剤と併用投与されてもよい。このような抗癌剤としては、特に制限されないが、例えば、シクロホスファミド水和物、イホスファミド、チオテパ、ブスルファラン、メルファラン、ニムスチン塩酸塩、ラニムスチン、ダカルパジン、テモゾロミド等のアルキル化剤；メトトレキサート、ペメトレキセドナトリウム水和物、フルオロウラシル、ドキシフルリジン、カペシタビン、タガフル、シタラビン、ゲムシタビン塩酸塩、フルダラビン燐酸エステル、ネララビン、クラドリビン、レボホリナートカルシウム等の代謝拮抗剤；ドキシソルピシン塩酸塩、ダウノルピシン塩酸塩、ブラルピシン、エピルピシン塩酸塩、イダルピシン塩酸塩、アクリルピシン塩酸塩、アムルピシン塩酸塩、ミトキサントロン塩酸塩、マイトマイシンC、アクチノマイシンD、プレオマシニン塩酸塩、プペロマシニン塩酸塩、ジノスタチンスチマラマー、カリケアマイシン等の抗生物質、ピンクリスチン硫酸塩、ピンブラスチン硫酸塩、ピンデシン硫酸塩、パクリタキセル等の微小管阻害剤；アナストロゾール、エキセメスタン、レトロゾール、ファドロゾール塩酸塩水和物等のアロマトラーゼ阻害剤；シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチン等の白金製剤；イリノテカン塩酸塩水和物、ノギテカン塩酸塩、エトポシド、ソブゾキサンのトポイソメラーゼ阻害剤、プレドニゾン、デキサメサゾンなどの副腎皮質ステロイド、サリドマイドおよびその誘導体であるレナリドマイド、プロテアーゼ阻害剤であるボルテゾミブ等が挙げられる。これらの抗癌剤は、1種単独で使用してもよく、また2種以上を組み合わせ使用してもよい。

【実施例】

【0043】

以下、実施例を挙げて本発明を説明する。但し、本発明は、以下の実施例に限定されて解釈されるものではない。

【0044】

製造例1：グルコース含有炭酸アパタイトの製造

500mg/mlとなるようにグルコースを蒸留水に添加して溶解させこれを直径0.2μmのフィルターでろ過し、グルコース溶液を調製した。このグルコース溶液100mlに、0.37gのNaHCO₃、90μlのNaH₂PO₄・2H₂O（1M）、及び180μlのCaCl₂（1M）をこの順に添加して溶解させ、1NのHClでpHを7.5に調整した。これを直径0.2μmのフィルターでろ過した。得られたバッファー（以下、「バッファーA」と表記することもある）1ml当たり、4μlのCaCl₂（1M）を混合し、37℃の水浴中で30分間インキュベートした。その後、15000rpm×5分で遠沈し、得られたペレットを生理食塩水に分散させ、グルコース含有炭酸アパタイト粒子の分散液を得て、これにアルブミンを0.5重量%となるように添加して10分間超音波振動処理にかけることにより、グルコース含有炭酸アパタイト粒子を含む製剤を得た。なお、超音波振動処理は、超音波振動機能を有するウォーターバスを用いて、20℃に設定した水に、プラスチック容器に収容した前記分散液を浮かべ、高周波出力55W、発振周波数38kHzの条件で10分間行った。斯して得られた製剤は、調製後直ちに、後述する試験に使用した。また、得られた製剤は、グルコース含有炭酸アパタイト粒子の粒径が10～30nmであることが、走査型プローブ顕微鏡を用いた測定において確認されている。

【0045】

また、比較のために、グルコースを添加しないこと以外は、前記と同条件の操作を行うことによって、炭酸アパタイト粒子が分散された製剤も調製した。得られた製剤は、炭酸

アパタイト粒子の平均粒径が10~30nmであることが、走査型プローブ顕微鏡を用いた測定において確認されている。

【0046】

製造例2：炭酸アパタイトのグルコース含有量の測定

グルコース溶液100ml中のグルコース量が10~50gとなるように変更したこと以外は、前記製造例1と同様の条件で、グルコース含有炭酸アパタイト粒子を含む製剤を製造した。得られたグルコース含有炭酸アパタイト粒子におけるグルコース量を自己検査用グルコースキット（グルテストエース、三和化学研究所社製）によって測定した。

【0047】

図1に、グルコース溶液100ml中に添加されているグルコース量（横軸）と、炭酸アパタイト粒子に内包されているグルコース量（縦軸）の関係を示す。この結果から、調製に使用したグルコース溶液中のグルコース濃度と、グルコース含有炭酸アパタイトに内包されるグルコース量には、直線的な相関関係があることが確認された。また、調製に使用した全グルコースの約0.2重量%が、最終的に、炭酸アパタイトの粒子に内包されて、グルコース含有炭酸アパタイトの形成に使用されることが確認された。

10

【0048】

実施例1：In vitroにおける癌細胞に対するグルコース含有炭酸アパタイトの抗腫瘍効果の評価1

グルコース含有炭酸アパタイトが、大腸癌細胞の増殖を抑制できるかを評価するために以下の試験を行った。

20

【0049】

ヒト大腸癌細胞株（HT29株）を24ウェルプレートに均等に播種し（ 1×10^4 細胞/ウェル）、一晚培養した。培養は、10%のウシ胎仔血清を添加したDMEM培地を用い、5%CO₂、37の条件で行った。次いで、各ウェルに、グルコース濃度に換算して2.5mg/mlに相当する量のグルコース含有炭酸アパタイト（sCA-Glc、製造例1に準じて製造）を添加して、5%CO₂、37の条件で48時間培養を行った。24時間後及び48時間後に、細胞数を計測した。また、sCA-Glcの代わりに炭酸アパタイト（sCA）を使用した場合、及びsCA-Glcを添加しなかった場合（Control）についても、前記と同条件で試験を行った。

【0050】

得られた結果を図2に示す。図2から明らかなように、sCA-Glcは、sCA及びコントロールに比して、培養24時間後及び48時間後におけるヒト大腸癌細胞数が有意に少なくなっていた。この結果から、sCA-Glcには、優れた抗腫瘍効果があることが明らかとなった。

30

【0051】

実施例2：In vitroにおける癌細胞に対するグルコース含有炭酸アパタイトの抗腫瘍効果の評価2

sCA-Glc添加後の培養時間を72時間に変更し、48時間後及び72時間後の細胞数を計測したこと以外は、前記実施例1と同条件で試験を行った。

【0052】

得られた結果を図3に示す。本試験でも、sCA-Glcが、sCA及びコントロールに比して、ヒト大腸癌細胞の増殖を顕著に抑制できていた。特に、培養72時間後には、sCA-Glcによってヒト大腸癌細胞の増殖が著しく抑制されていた。この結果からも、sCA-Glcには、優れた抗腫瘍効果があることが明らかとなった。

40

【0053】

実施例3：腫瘍モデルマウスにおけるグルコース含有炭酸アパタイトの抗腫瘍効果の評価1

7週齢のBALB/cAヌードマウス（日本クレア社製）の背部左右に、ヒト大腸癌細胞であるHCT116株を皮下注射し、固形腫瘍を有するモデルマウスを作製した。腫瘍が70~170mm³の大きさに達した時点でマウスをランダムに、sCA-Glc投与群（n=6）と生理食塩水投与群（n=11）の2グループに分けた。腫瘍が70~170mm³の大きさに達した時点として、0日、2日、4日、7日、9日、及び11日に、表1に示す態様で薬物投与を行った。4

50

日、7日、11日、15日に、マウス皮下の腫瘍サイズを計測した。また、15日に、マウスから腫瘍を摘出し、ヘマトキシリン・エオシン染色（HE染色）した。

【0054】

【表1】

群	投与態様
sCA-Glc投与群	製造例1で調製したsCA-Glc（グルコース50mgを内包した炭酸アパタイト）を含む生理食塩水200 μ lを1日1回、尾静脈投与
生理食塩水(saline)投与群	生理食塩水200 μ lを1日1回、尾静脈投与

10

【0055】

腫瘍サイズの経時変化を図4、15日に摘出した腫瘍の重量を図5、15日に摘出した腫瘍の観察結果を図6、及び15日に摘出した腫瘍をHE染色した結果を図7に、それぞれ示す。この結果から、sCA-Glc投与群では、生理食塩水投与群に比べて、腫瘍サイズが小さくなっており（図4～6）、更に腫瘍組織中で死滅している癌細胞数が多くなっていた（図7）。即ち、この結果からも、sCA-Glcには、優れた抗腫瘍効果があることが確認された。

【0056】

実施例4：腫瘍モデルマウスにおけるグルコース含有炭酸アパタイトの抗腫瘍効果の評価

20

2

7週齢のBALB/cAヌードマウス（日本クレア社製）の背部左右に、ヒト大腸癌細胞であるHCT116株を皮下注射し、固形腫瘍を有するモデルマウスを作製した。腫瘍が200mm³の大きさに達した時点でマウスをランダムに、sCA-Glc(5 i.v.)投与群（n=8）、sCA-Glc(7 i.v.)投与群（n=8）、及びコントロール群（n=8）の3グループに分けた。腫瘍が200mm³の大きさに達した時点として、表2に示す態様で薬物投与を行った。4日、7日、11日に、マウス皮下の腫瘍サイズを計測した。

【0057】

【表2】

群	投与態様
sCA-Glc(5 i.v.)投与群	0日、1日、2日、3日、及び4日に、製造例1で調製したsCA-Glc（グルコース100mgを内包した炭酸アパタイト）を含む生理食塩水200 μ lを1日1回、尾静脈投与
sCA-Glc(7 i.v.)投与群	0日、1日、2日、3日、4日、5日及び6日に、製造例1で調製したsCA-Glc（グルコース100mgを内包した炭酸アパタイト）を含む生理食塩水200 μ lを1日1回、尾静脈投与
コントロール群	生理食塩水200 μ lを1日1回、尾静脈投与

30

40

【0058】

また、前記と同様の方法で、固形腫瘍を有するモデルマウスを作製し、腫瘍が200mm³の大きさに達した時点でマウスをランダムに、sCA-Glc投与群（n=7）とコントロール群（n=2）に分けた。腫瘍が200mm³の大きさに達した時点として、表3に示す態様で薬物投与を行った。14日に、マウスから採血し、血液の生化学検査を行った。

【0059】

【表 3】

群	投与態様
sCA-Glc投与群	0日、2日、4日、6日、8日、10日、及び12日に、製造例1で調製したsCA-Glc（グルコース50mgを内包した炭酸アパタイト）を含む生理食塩水200 μ lを1日回、尾静脈投与
コントロール群	0日、2日、4日、6日、8日、10日、及び12日に、生理食塩水200 μ lを1日回、尾静脈投与

10

【0060】

腫瘍サイズの経時変化を図8、血液の生化学検査の結果を表4に、それぞれ示す。この結果から、sCA-Glcの投与開始時に、腫瘍が200mm³に達しているにも拘らず、sCA-Glcの投与によって腫瘍サイズの有意な減少が確認された。即ち、この結果からも、sCA-Glcには、優れた抗腫瘍効果があることが確認された。

【0061】

【表 4】

	コントロール群1	コントロール群2	sCA-Glc投与群 (n=7)	基準値
ALB (G/DL)	3.8	4.2	3.5 \pm 0.2 ↓	3.8~4.2
ALP (U/L)	41	27 ↓	49.0 \pm 16.8	40~112
ALT (U/L)	103 ↑	92 ↑	63.5 \pm 8.4 ↑	5~40
AMY (U/L)	1013	899	911 \pm 60.0	420~1200
TBIL (MG/DL)	0.2 ↑	HEM	0.2 \pm 0.1	~0.1
BUN (MG/DL)	17 ↓	18 ↓	17.7 \pm 2.6 ↓	20~30
CA (MG/DL)	10.5 ↑	11.2 ↑	10.3 \pm 0.3 ↑	8.8~9.6
PHOS (MG/DL)	13.3 ↑	15.2 ↑	11.4 \pm 1.3 ↑	7.8~8.0
GLU (MG/DL)	119	115	97.6 \pm 16.8	119~132
NA ⁺ (MOL/DL)	157 ↑	160 ↑	155 \pm 2.0 ↑	147~151
TP (G/DL)	5.8 ↓	6.2	5.7 \pm 0.1 ↓	6.0~7.2

20

30

40

表中、コントロール群1及び2には、2匹のコントロール群のモデルマウスにおける各個体の血液生化学検査の結果を示す。また、sCA-Glc投与群(n=7)については、7匹のモデルマウスにおける血液生化学検査の結果を「mean \pm S.D」として示す。

【0062】

実施例4：腫瘍モデルマウスにおけるグルコース含有炭酸アパタイトの投与による腫瘍中のグルコース量の評価

7週齢のBALB/cヌードマウス（日本クレア社製）の背部左右に、ヒト咽頭癌細

50

胞である F a D u 株を皮下注射し、固形腫瘍を有するモデルマウスを作製した。腫瘍が 10 mm^3 の大きさに達した時点でマウスをランダムに、sCA-Glc投与群 (n=2) とグルコース投与群 (n=2) の 2 グループに分けて、表 5 に示す態様で薬物投与を行った。投与から 3 時間後及び 1 2 時間後に、マウスから腫瘍を摘出し、腫瘍中のグルコース量を自己検査用グルコースキット (グルテストエース、三和化学研究所社製) により測定した。

【 0 0 6 3 】

【表 5】

群	投与態様
sCA-Glc投与群	製造例 1 で調製したsCA-Glc (グルコース量換算100mg相当量) 含む生理食塩水200 μ lを尾静脈投与
グルコース投与群	グルコース100mgを含む生理食塩水200 μ lを尾静脈投与

10

【 0 0 6 4 】

投与から 3 時間後に腫瘍中のグルコース量を測定した結果を図 9 に示す。この結果から、sCA-Glc投与群では、グルコース投与群に比べて、腫瘍中のグルコース量が増大しており、炭酸アパタイトによってグルコースが効率的に腫瘍に送達されていることが明らかとなった。

【 0 0 6 5 】

参考例 1 : 腫瘍組織における間質液圧の低下

20

7 週齢のBALB/cAヌードマウス (日本クレア社製) の背部左右に、ヒト大腸癌細胞であるHT29株 (5×10^6 個) を皮下注射し、マウス皮下固形腫瘍モデルを作製した。腫瘍の直径が約10mmになった時点で、前記製造例 1 で調製した炭酸アパタイト粒子 (グルコース不含有、50mlのバッファA から調製される量に相当) を尾静脈投与した。炭酸アパタイト粒子の投与2.5~4時間後に1.6Fr圧カテーテル付きの生体内圧カテーテル計測システム (transonic science, Inc) を用いて、腫瘍内の間質液圧を測定した (測定対象腫瘍数 3 つ、n=39)。また、コントロールとして、炭酸アパタイト粒子の投与前の腫瘍内の間質液圧についても測定した (測定対象腫瘍数 5 つ、n=30)。

【 0 0 6 6 】

得られた結果を表 6 に示す。この結果から、炭酸アパタイト粒子には、腫瘍内の間質液圧を低下させる作用があることが明らかとなった。この結果を踏まえると、前記実施例において認められたsCA-Glcによる抗腫瘍効果は、炭酸アパタイト粒子による腫瘍内の間質液圧の低減作用も関与していることが示唆された。

30

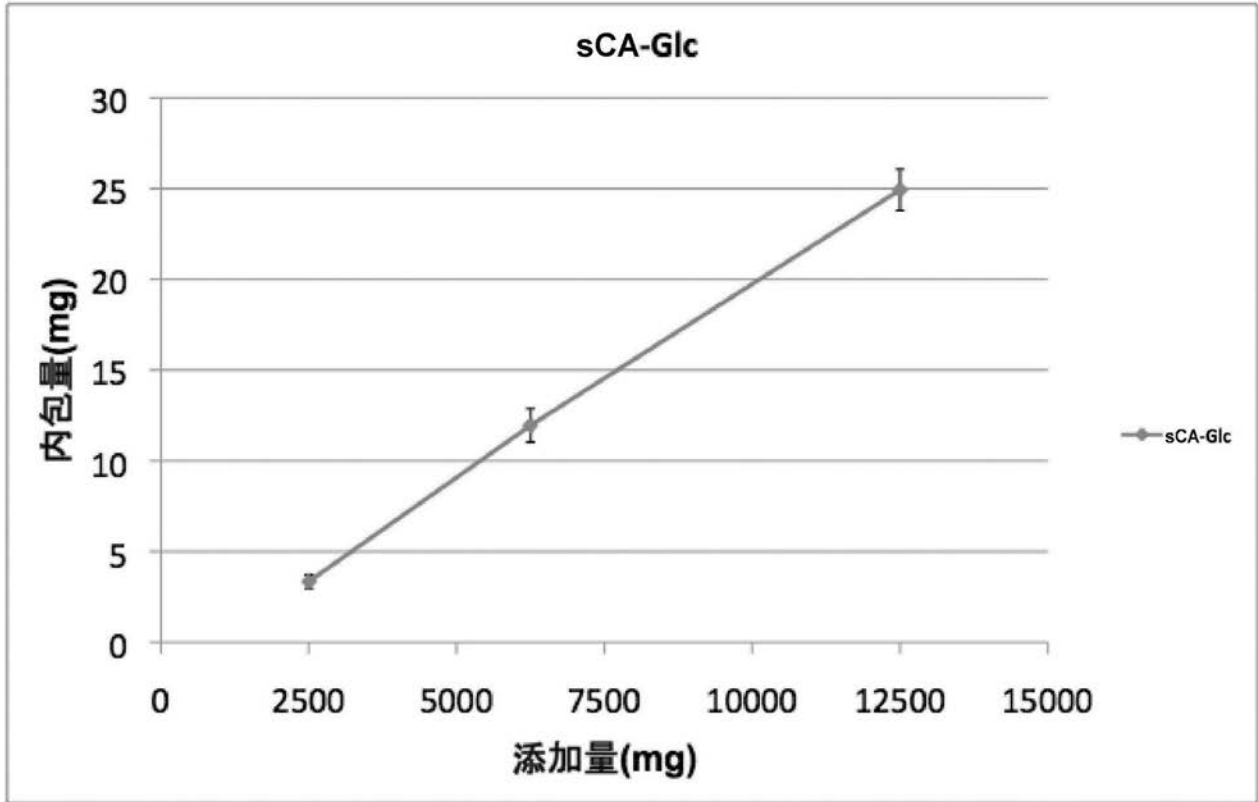
【 0 0 6 7 】

【表 6】

	腫瘍内の間質液圧の 平均値 (mmHg)	標準偏差	平均の標準誤差
炭酸アパタイト粒子の投与前 (n = 3 0)	30.92	15.72	2.87
炭酸アパタイト粒子の投与2. 5~4時間後 (n = 3 9)	13.40	11.49	1.84

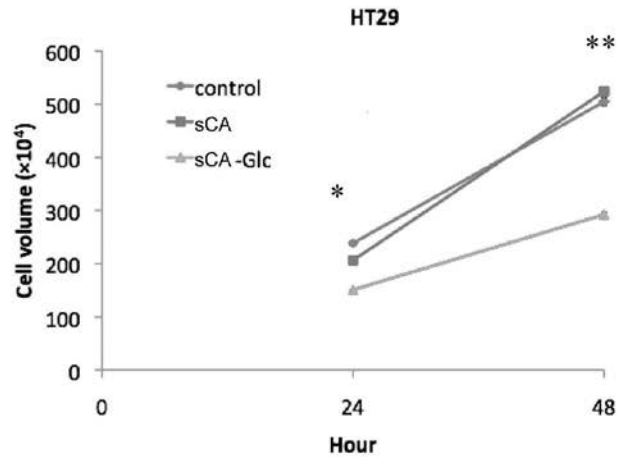
40

【 図 1 】



マウスi.v.一回投与量100mg
50%ブドウ糖 200ul

【 図 2 】



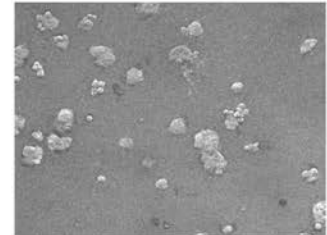
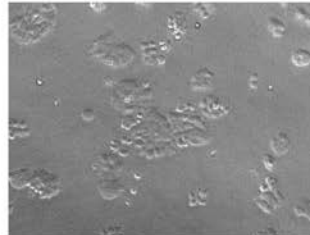
48hr

control

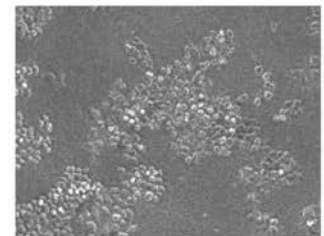
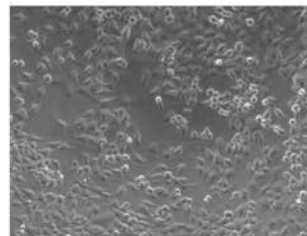
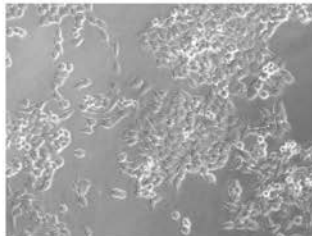
sCA

sCA-Glc

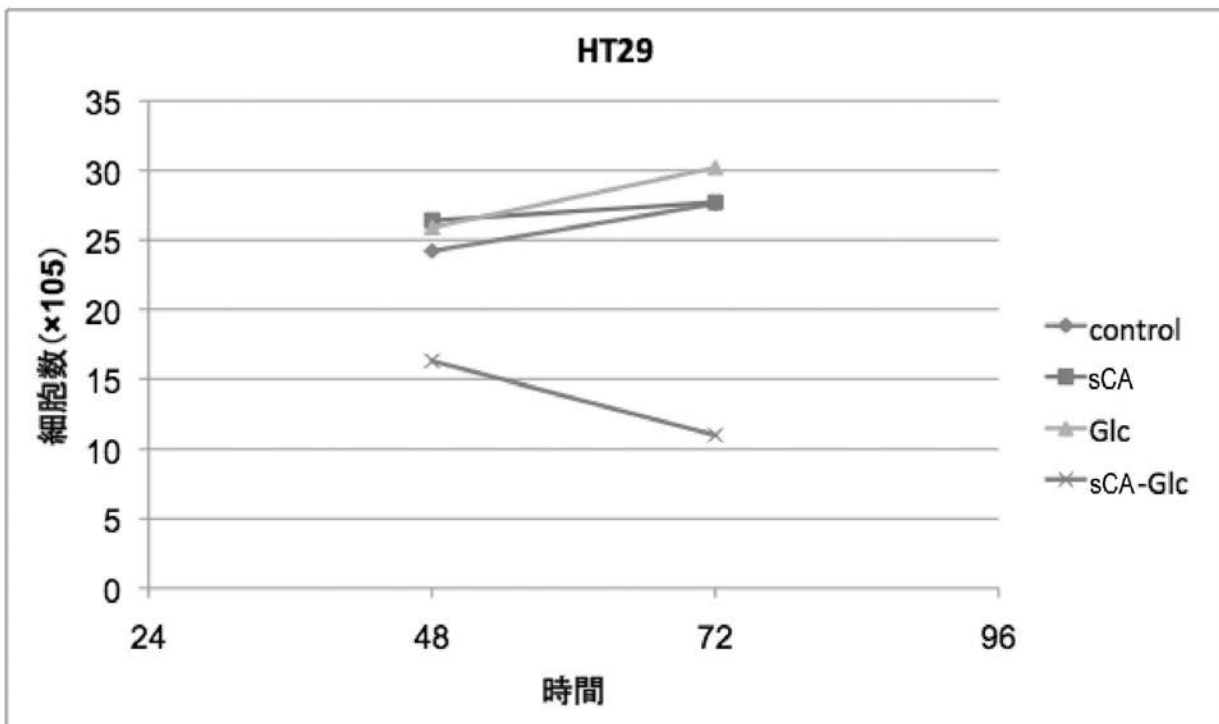
HT29



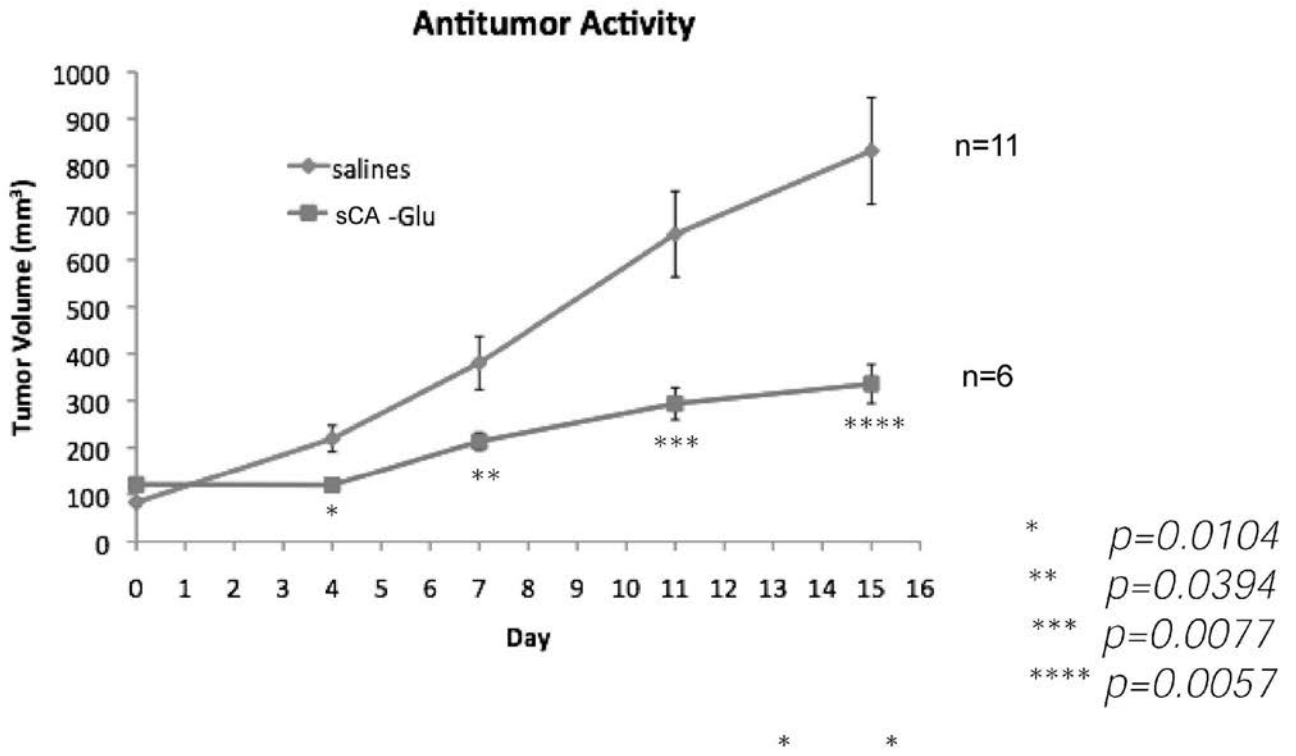
HCT116



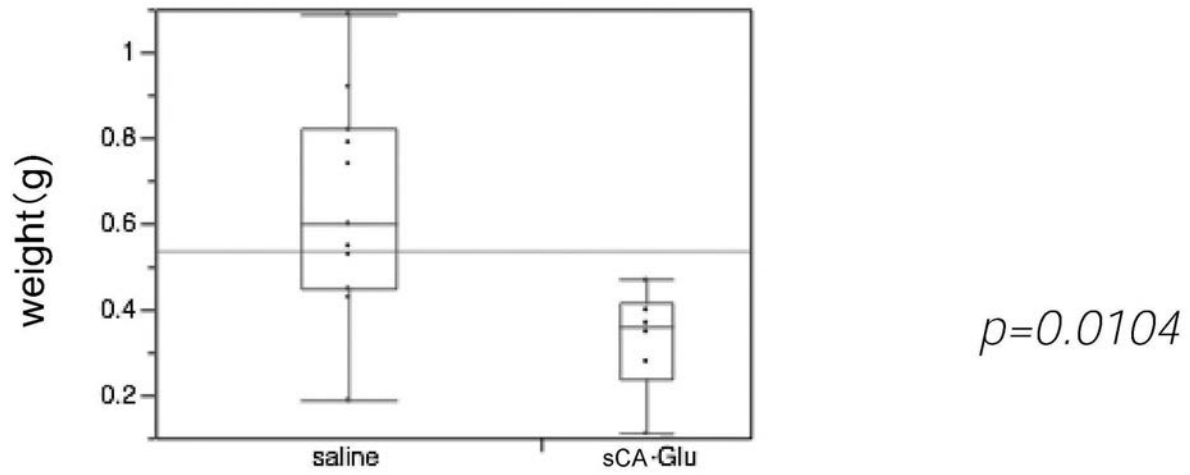
【 図 3 】



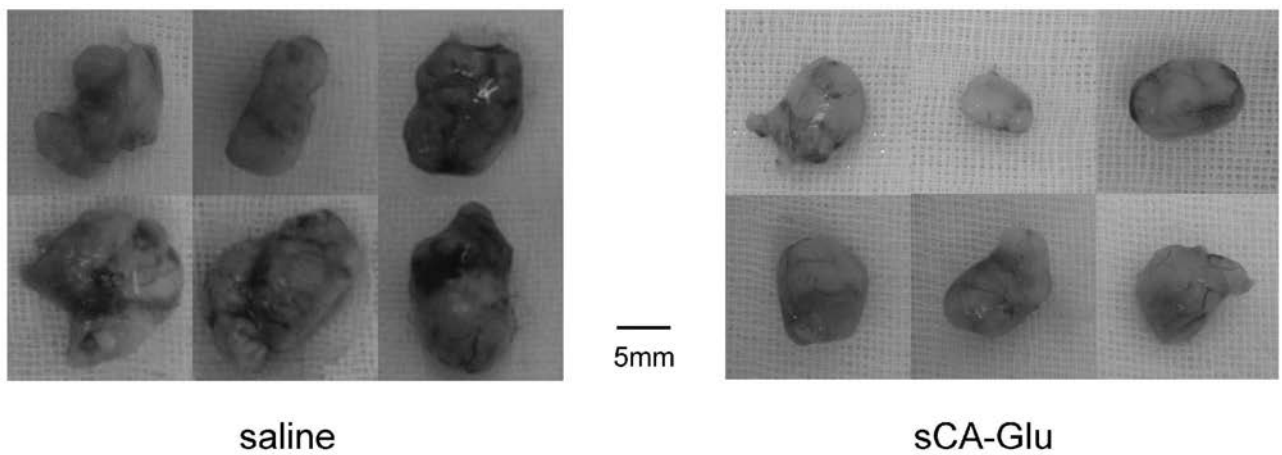
【 図 4 】



【 図 5 】



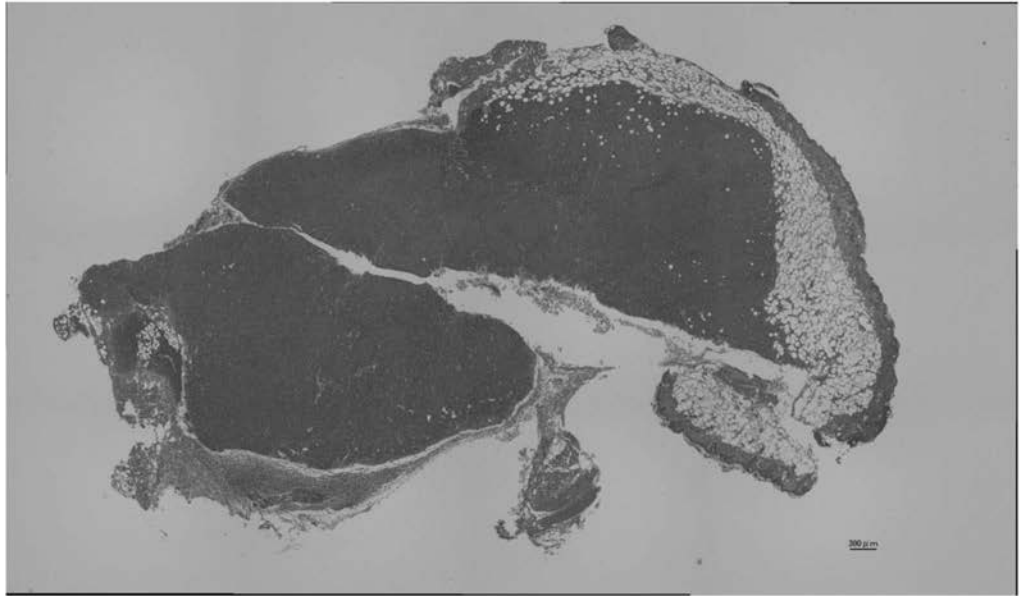
【 図 6 】



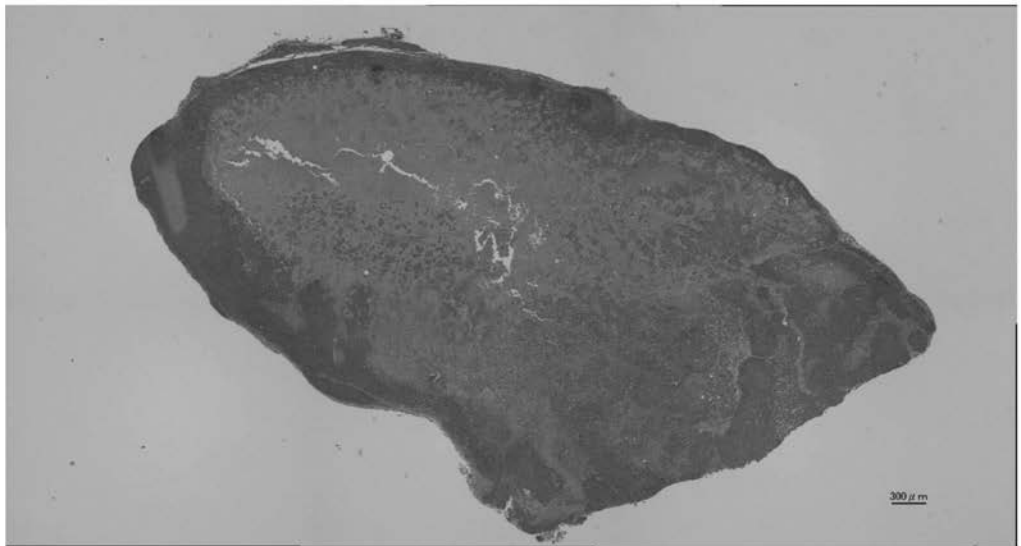
【 図 7 】

HE stain

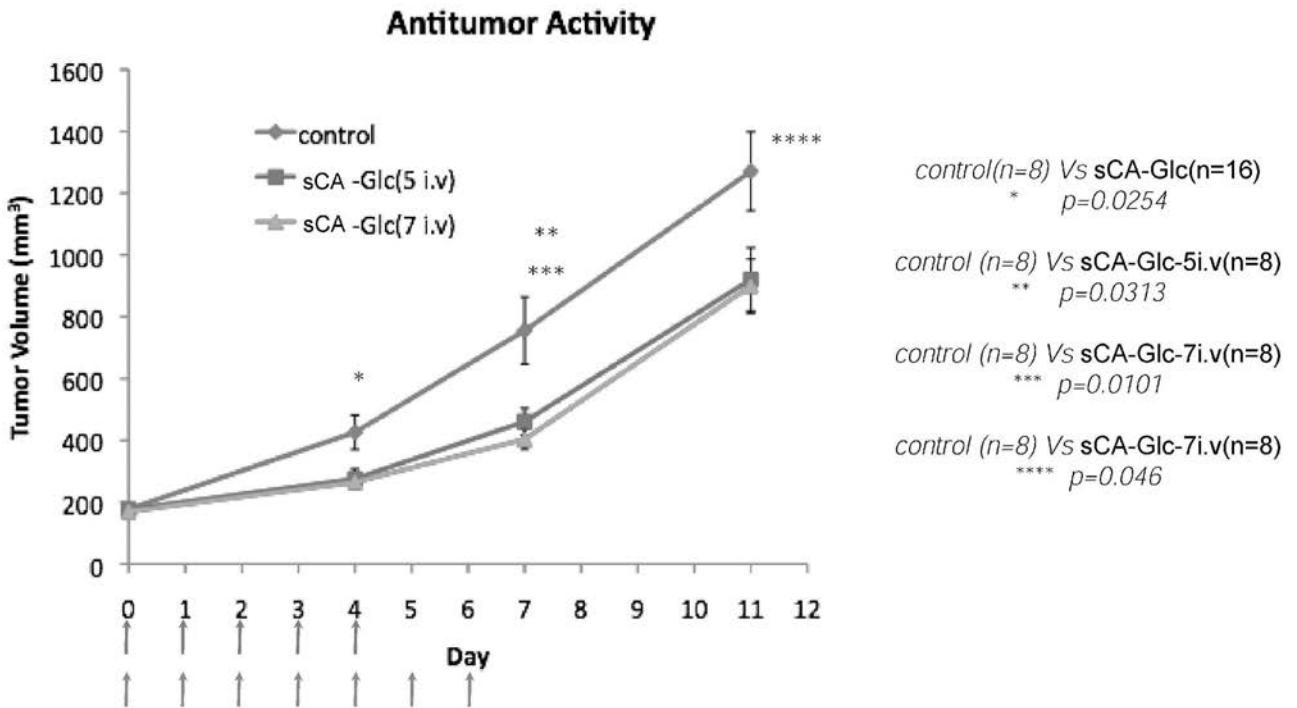
saline



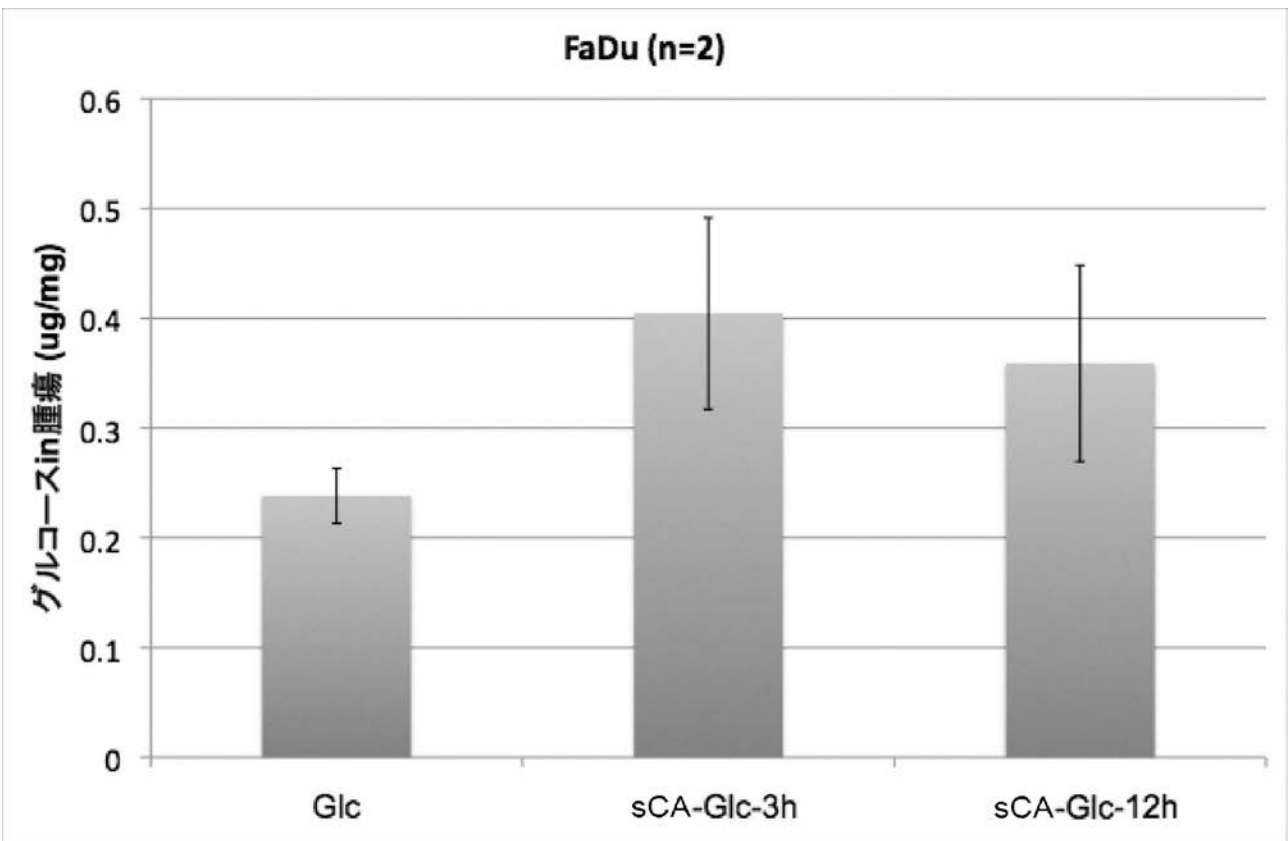
sCA-Glc



【 図 8 】



【 図 9 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
B 8 2 Y 5/00	(2011.01)	B 8 2 Y	5/00	
B 8 2 Y 40/00	(2011.01)	B 8 2 Y	40/00	
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	

(72)発明者 山本 浩文
大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 土岐 祐一郎
大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 森 正樹
大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 中西 弘幸
大阪府堺市堺区熊野町東 4 丁 4 - 1 9 中西胃腸外科

F ターム(参考) 4C076 AA22 CC27 EE41F EE41Q
4C084 AA02 AA03 BA44 DC50 MA02 NA14 ZB261 ZC751
4C086 AA01 AA02 EA01 HA04 MA01 MA04 MA21 NA14 ZB26 ZC75