

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5707534号
(P5707534)

(45) 発行日 平成27年4月30日 (2015. 4. 30)

(24) 登録日 平成27年3月6日 (2015. 3. 6)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K 31/365 (2006. 01)

A 6 1 K 31/365

A 6 1 K 31/7034 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7034

A 6 1 K 36/28 (2006. 01)

A 6 1 K 35/78

T

A 6 1 K 36/00 (2006. 01)

A 6 1 K 35/78

X

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 7 (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2014-507890 (P2014-507890)

(86) (22) 出願日 平成25年3月26日 (2013. 3. 26)

(86) 国際出願番号 PCT/JP2013/058692

(87) 国際公開番号 W02013/146734

(87) 国際公開日 平成25年10月3日 (2013. 10. 3)

審査請求日 平成26年7月18日 (2014. 7. 18)

(31) 優先権主張番号 特願2012-69964 (P2012-69964)

(32) 優先日 平成24年3月26日 (2012. 3. 26)

(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 306018343

クラシエ製薬株式会社

東京都港区海岸3丁目20番20号

(73) 特許権者 510097747

独立行政法人国立がん研究センター

東京都中央区築地五丁目1番1号

(73) 特許権者 305060567

国立大学法人富山大学

富山県富山市五福3190

(74) 代理人 100150142

弁理士 相原 礼路

(74) 代理人 100174849

弁理士 森脇 理生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗癌剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アルクチゲニンを含む、抗癌剤治療に抵抗性となった癌を治療するための抗癌剤。

【請求項 2】

さらにアルクチンを含む、請求項1に記載の抗癌剤。

【請求項 3】

アルクチゲニンおよびアルクチンを、アルクチゲニン / アルクチン = 0.7 ~ 1.3 の重量比にて含有する、請求項2に記載の抗癌剤。

【請求項 4】

前記アルクチゲニンおよび前記アルクチンがゴボウ、ゴボウシ、ゴボウスプラウトまたはレンギョウ由来である、請求項2または3に記載の抗癌剤。

【請求項 5】

抗癌幹細胞作用を伴う、請求項1~4のいずれか1項に記載の抗癌剤。

【請求項 6】

アルクチゲニンおよびアルクチンを含む、癌の治療後の転移または再発防止剤。

【請求項 7】

アルクチゲニンおよびアルクチンを、アルクチゲニン / アルクチン = 0.7 ~ 1.3 の重量比にて含有する、請求項6に記載の転移または再発防止剤。

【発明の詳細な説明】

10

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、アルクチゲニンを含む抗がん剤に関する。より詳細には、本発明は、アルクチゲニンを1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有する抗がん剤に関する。

【背景技術】

【0002】

膵臓癌は難治性がんの一つであり、患者全体の5年生存率は2-3%と推定されている。膵臓癌で死亡する患者数は最近20年間に約2.5倍と急速に増加し、2009年の統計では26,791人が膵臓癌で死亡している。発生数と死亡数とはほぼ同数であり、これは日本におけるがんの死因の6%を占め、部位別がん死亡数では、肺、胃、大腸、肝に次いで第5位である。

10

【0003】

根治が期待できる治療は、外科的切除のみであるが、膵臓癌は多くの患者が、進行癌（stageIII+IV）の状態で発見されるため、実際に根治的切除が可能であるのは膵臓癌患者全体の約10-20%とされている。Stage毎の生存期間中央値はStageI、IIで約12-30ヶ月、StageIIIで9-11ヶ月、StageIVで5-6ヶ月程度と、非常に予後不良であり、特に切除不能である患者には治療する可能性は殆どないと考えられている。

【0004】

進行膵臓癌に対する標準治療はゲムシタビンであり、ゲムシタビンが不応となった場合の標準的な治療法は確立されていない。進行膵臓癌患者においてはゲムシタビンに不応になった時点においても、全身状態の良好な症例も認められ、このような患者群（ゲムシタビン不応膵臓癌）における有効な治療法の開発は、膵臓癌の治療法開発全体において重要な課題であると考えられている。

20

【0005】

近年、PANC-1、AsPC-1、BxPC-1およびKP-3などの膵臓癌由来の細胞は、極度の栄養飢餓状態においても強い耐性が見られ、その耐性を解除することが癌治療における新しい生化学的アプローチとなる可能性が報告されている（特許文献1）。

【0006】

膵臓癌細胞株PANC-1を使用して、低栄養状態における腫瘍細胞の生存能力を解除できる物質のスクリーニングを行ったところ、アルクチゲニンが有効であることが報告されている（非特許文献1）。

30

【0007】

ここで、ゴボウシは、日局15でゴボウ *Arctium lappa* Linne (Compositae)の果実であると規定されている。また、ゴボウシは、銀翹散、駆風解毒湯、消風散などに処方される生薬であり、専ら医薬品として使用される成分本質に分類される。

【0008】

ゴボウシは、リグナン配糖体に分類されるアルクチンを約7%およびそのアグリコンであるアルクチゲニンを約0.6%含む。これらの知見から、アルクチゲニンを含むゴボウシ抽出物は、癌を治療するための抗がん剤として使用できると期待される。

【先行技術文献】

40

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】日本国公開特許公報「特開2002 - 065298号公報」

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】S. AwaLe, J. Lu, S. K. KaLauni, Y. Kurashima, Y. Tezuka, S. Kado ta, H. Esumi, *Cancer Res.*, 2006, 66(3), 1751-1757。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

50

本発明は、癌に対して効果を有する新規な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】

【0012】

現在知られているゴボウシは、ゴボウシ中のアルクチゲニン含量が約0.6%と低い。また、水に溶解難い。このため、従来利用されている熱水抽出法では、アルクチゲニンを高含量で含有するゴボウシ抽出物を製造することがきわめて困難であった。

【0013】

また、膵臓癌などの治療に使用するにあたり、有効成分であるアルクチゲニンが一定の含有量となるゴボウシ抽出物の提供が望まれているが、上記のとおり、アルクチゲニン高含有ゴボウシ抽出物の製造において、アルクチインをアルクチゲニンに変換し、水に溶解難いアルクチゲニンを一定の含有量となるように制御することは困難であった。

【0014】

さらに、膵臓癌などの治療に使用するにあたり、アルクチゲニンが主要な有効成分であるとともに、アルクチゲニンおよびアルクチインを一定含量で含むゴボウシ抽出物は、特に抗癌効果が優れていることが分かってきている。このため、アルクチゲニン高含有ゴボウシ抽出物の製造において、アルクチゲニンおよびアルクチインを一定の含有量となるように制御することができる製造方法が望まれる。特に、アルクチゲニンおよびアルクチインを約1:1の重量比で含有するゴボウシ抽出物を製造することができる方法が望まれる。

【0015】

本発明者らは、これらの課題を解決するために鋭意検討を行った結果、原料とするゴボウシ内在の α -グルコシダーゼ酵素活性、ゴボウシを切裁する粒径、アルクチインをアルクチゲニンに酵素変換する際の温度およびゴボウシからアルクチゲニンおよびアルクチインを抽出する際の温度を調整することにより、アルクチゲニンを一定の含有量とする技術、並びにアルクチゲニンおよびアルクチインの含有比を調節する技術を見出した。

【0016】

そして、本発明者らは、これらの技術によって得られたゴボウシ抽出物を用いて、アルクチゲニンの1日あたりの投与量が100mg以上となるように調製した剤を膵臓癌患者に投与したところ、腫瘍縮小効果を観察するとともに、腫瘍マーカーの低下を確認した。本発明は、この驚くべき知見に基づき完成されたものである。

【0017】

すなわち、本発明は、アルクチゲニンを1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有する、抗癌剤を提供する。

【0018】

また、本発明は、さらにアルクチインを1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有する上記抗癌剤を提供する。

【0019】

また、本発明は、アルクチゲニンおよびアルクチインを、アルクチゲニン/アルクチイン=0.7~1.3の重量比にて含有する抗癌剤を提供する。

【0020】

また、本発明は、上記アルクチゲニンおよび上記アルクチインがゴボウシ由来である上記抗癌剤を提供する。

【0021】

また、本発明は、ゲムシタピンによる治療に不応答である膵臓癌を治療するための上記抗癌剤を提供する。

【0022】

また、本発明は、アルクチゲニンを含有する、抗癌幹細胞剤を提供する。

【0023】

また、本発明は、アルクチゲニンを1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有する、抗癌幹細胞剤を提供する。

【発明の効果】

【 0 0 2 4 】

本発明により、癌に対して効果を有する新規な抗癌剤を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 5 】

【図 1】本発明の一実施例の顆粒剤投与前 (A)、投与開始1か月後 (B)、2か月後 (C) および3か月後 (D) の胸腹部造影CTの結果を示す図。

【図 2】本発明の一実施例の顆粒剤投与前 (A)、投与開始1か月後 (B)、2か月後 (C) および3か月後 (D) の胸腹部造影CTの結果を示す図。

【図 3】本発明の一実施例の顆粒剤投与前 (A)、投与開始1か月後 (B)、2か月後 (C) および3か月後 (D) の胸腹部造影CTの結果を示す図。

【図 4】腫瘍モデル動物 (CAPAN-1 Xenografts) における抗腫瘍性の評価の結果を示す図。

【図 5】腫瘍モデル動物 (PSN-1 Xenografts) における抗腫瘍性の評価の結果を示す図。

【図 6】癌幹細胞に対するPI染色および膀胱癌幹細胞マーカー (CD44, CD24, ESA) 染色の結果を示す図。

【図 7】癌幹細胞に対するPI染色および膀胱癌幹細胞マーカー (CD44, c-Met) 染色の結果を示す図。

【図 8】癌幹細胞に対するPI染色および膀胱癌幹細胞マーカー染色の結果 (シスプラチン処理との比較) を示す図。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 6 】

以下、本発明について詳細に説明する。開示する条件は一例であり、これに限定されるものではない。

【 0 0 2 7 】

本発明の抗癌剤は、有効成分として、アルクチゲニンを1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有する。アルクチゲニンは、アルクチゲニンを含有する植物由来であってもよく、たとえばゴボウシ由来であってもよい。すなわち、本発明の抗癌剤は、植物からの抽出物、たとえばゴボウシから得たゴボウシ抽出物に含まれるアルクチゲニンを有効成分として含有してもよい。

【 0 0 2 8 】

本発明の抗癌剤はまた、さらに有効成分としてアルクチインを1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有してもよい。アルクチインは、アルクチインを含有する植物由来であってもよく、たとえばゴボウシ由来であってもよい。すなわち、本発明の抗癌剤は、植物からの抽出物、たとえばゴボウシから得たゴボウシ抽出物に含まれるアルクチインを有効成分として含有してもよい。

【 0 0 2 9 】

本発明の抗癌剤はまた、有効成分として、アルクチゲニンおよびアルクチインを、アルクチゲニン / アルクチイン = 0.7 ~ 1.3 の重量比 (1.0 ~ 1.9 のモル比) にて含有するものであってもよい。アルクチゲニンおよびアルクチインは、アルクチゲニンおよびアルクチインを含有する植物由来であってもよく、たとえばゴボウシ由来であってもよい。すなわち、本発明の抗癌剤は、アルクチゲニンおよびアルクチインを、アルクチゲニン / アルクチイン = 0.7 ~ 1.3 の重量比にて含有する植物の抽出物、たとえばゴボウシ抽出物を含有してもよい。また、この抗癌剤において、アルクチゲニンは、1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有されていてもよく、またアルクチインは、1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有されていてもよい。

【 0 0 3 0 】

アルクチゲニンおよびアルクチインを含有する植物は、特に限定されないが、たとえばゴボウ (スプラウト・葉・根茎)、ペニバナ、ヤグルマギク、アメリカオニアザミ、サントリソウ (ギバナアザミ)、カルドン、ゴロツキアザミ、アニウロコアザミ、アイノコレ

10

20

30

40

50

ンギョウ、チョウセンレンギョウ、レンギョウ、シナレンギョウ、ゴマ、モミジヒルガオ、シンチクヒメハギ、チョウセンテイカカズラ、テイカカズラ、ムニンテイカカズラ、ヒメテイカカズラ、トウキョウチクトウ、ケテイカカズラ、リョウカオウ、オオケタデ、ヤマザクラ、シロイヌナズナ、アマランス、クルミ、エンバク、スペルタコムギ、軟質コムギ、メキシコイトスギおよびカヤなどを含む。なかでも、ゴボウおよびレンギョウは、アルクチゲニン含有量が高いため好ましい。

【0031】

本発明において、アルクチゲニンおよびアルクチインがゴボウシ由来である場合には、後述するゴボウシ抽出物の製造方法を用いて得られるゴボウシ抽出物を用いることができる。そのため、製造時の生産性を向上させることができ、安価にかつ簡便に抗癌剤を調製することができる。また、ゴボウシ以外の植物を用いる場合にも、後述する製造方法を利用することにより、アルクチゲニンおよびアルクチインを含有する抽出物を容易に得ることが可能である。

10

【0032】

後述するゴボウシ抽出物の製造方法によって得られる抽出物粉末は、アルクチゲニンおよびアルクチインをアルクチゲニン/アルクチイン=0.7~1.3の重量比で含有する。したがって、このゴボウシ抽出物の製造方法によって得られる抽出物粉末は、従来のゴボウシ抽出物と比較して、優れた抗癌効果を有する本発明の抗癌剤として使用することができる。

【0033】

20

本発明の抗癌剤は、さらに任意の成分を含むことができる。たとえば、本発明の抗癌剤は、薬学的に許容される基剤、担体、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤および着色剤などを含む形態にて提供することができる。

【0034】

抗癌剤に使用する担体および賦形剤の例には、乳糖、ブドウ糖、白糖、マンニトール、デキストリン、馬鈴薯デンプン、トウモロコシデンプン、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、硫酸カルシウムおよび結晶セルロースなどを含む。

【0035】

また、結合剤の例には、デンプン、ゼラチン、シロップ、トラガントゴム、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、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースなどを含む。

30

【0036】

また、崩壊剤の例には、デンプン、寒天、ゼラチン末、結晶セルロース、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよびカルボキシメチルセルロースカルシウムなどを含む。

【0037】

また、滑沢剤の例には、ステアリン酸マグネシウム、水素添加植物油、タルクおよびマクロゴールなどを含む。また、着色剤は、医薬品に添加することが許容されている任意の着色剤を使用することができる。

40

【0038】

また、抗癌剤は、必要に応じて、白糖、ゼラチン、精製セラック、ゼラチン、グリセリン、ソルビトール、エチルセルロース、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、ポリビニルピロリドン、フタル酸セルロースアセテート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メチルメタクリレートおよびメタアクリル酸重合体などで一層以上の層で被膜してもよい。

また、必要に応じて、pH調節剤、緩衝剤、安定化剤および可溶化剤などを添加してもよい。

【0039】

また、抗癌剤は、任意の形態の製剤として提供することができる。たとえば、抗癌剤は

50

、経口投与製剤として、糖衣錠、バツカル錠、コーティング錠およびチュアブル錠等の錠剤、トローチ剤、丸剤、散剤およびソフトカプセルを含むカプセル剤、顆粒剤、懸濁剤、乳剤、ドライシロップを含むシロップ剤、エリキシル剤等の液剤であることができる。

【0040】

また、抗癌剤は、非経口投与のために、静脈注射、皮下注射、腹腔内注射、筋肉内注射、経皮投与、経鼻投与、経肺投与、経腸投与、口腔内投与および経粘膜投与などの投与のための製剤であることができる。たとえば、注射剤、経皮吸収テープ、エアゾール剤および坐剤などであることができる。また、抽出物粉末が特有のえぐみを有することから、抽出物粉末をマスキングする製剤としたり、被覆剤で被覆するフィルムコート剤としたりすることができる。

10

【0041】

一方、後述するゴボウシ抽出物の製造方法によって得られた抽出物粉末は、そのままの形で抗癌剤として使用することもできる。

【0042】

本発明の抗癌剤は、精製したアルクチゲニンおよび他の成分を混合して製造してもよいし、以下に記述する方法により製造されるゴボウシ抽出物を用いて製造してもよい。

【0043】

ゴボウシ抽出物は、生薬切裁工程、抽出工程（酵素変換工程および有機溶媒による抽出工程）、固液分離工程、濃縮工程および乾燥工程を経て製造される。

【0044】

（生薬切裁工程）

本発明の抗癌剤に用いるゴボウシ抽出物の製造方法では、原料とするゴボウシを抽出に適した大きさに切裁する。原料となる生薬は、植物の様々な部位や鉱物、動物など種々の大きさ、形状、固さがあり、その特質に応じた切裁が必要となる。

ゴボウシは、当業者に公知の任意の手段を使用して切裁することができる。たとえば、市販の切裁機を使用することができる。

20

【0045】

本発明の抗癌剤に用いるゴボウシ抽出物の製造方法では、ゴボウシに内在する酵素である α -グルコシダーゼの活性を事前に測定し、本発明の製造に適したゴボウシを選択することができる。

30

【0046】

α -グルコシダーゼの活性を測定する方法としては、たとえば p -ニトロフェニル- α -D-グルコピラノシド ($C_{12}H_{15}NO_8$ ：分子量301.25) (SIGMA-ALDRICH社製) を基質として、ゴボウシ粉碎品を作用させることで生成する p -ニトロフェノールを400nmの吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を測定できる。酵素活性を表す単位として1分間に1マイクロモルの p -ニトロフェノールを生成する酵素量を1単位 (U) として表すことができる。

【0047】

アルクチゲニンおよびアルクチインをアルクチゲニン/アルクチイン = 0.7 ~ 1.3の重量比で含有するゴボウシ抽出物を得るためには、ゴボウシに内在する α -グルコシダーゼの活性が、たとえば0.4U/g以上、好ましくは1U/g以上のゴボウシを用いることができる。

40

0.4U/g未満の場合は、加水分解が不十分となり、アルクチゲニンの重量比が下がり、所望のゴボウシ抽出物を効率的に得られなくなる。

【0048】

また、本発明の抗癌剤に用いるゴボウシ抽出物の製造方法では、任意の粒径に切裁されたゴボウシを使用することができる。切裁されたゴボウシの粒径が小さいほど酵素変換が促進され、抽出物収率も上昇すると考えられる。その反面、粒径が小さすぎると、酵素変換が速過ぎてプロセス管理が困難になったり、後の工程において正確な固液分離に支障が生じたりすることがある。

【0049】

アルクチゲニンおよびアルクチインをアルクチゲニン/アルクチイン = 0.7 ~ 1.3の重量

50

比で含有するゴボウシ抽出物を得るためには、以下の実施例に示したように、ゴボウシは、9.5mm以下の粒径に、たとえば9.5mmの篩を全通するように切裁される。

【0050】

また、アルクチゲニンおよびアルクチインをアルクチゲニン / アルクチイン = 0.7 ~ 1.3の重量比で含有するゴボウシ抽出物を得るためには、ゴボウシの粒径が、9.5mm篩を全量通過し、たとえば0.85mmの篩に60 ~ 100%が分布するように、さらに好ましくは0.85mmの篩に65 ~ 80%が分布するように切裁されることが望ましい。

【0051】

(抽出工程)

抽出工程は、生薬抽出物粉末製造工程中で、品質上最も重要な工程である。この抽出工程により、生薬抽出物粉末の品質が決まる。本発明のゴボウシ抽出物の製造方法では、ゴボウシ抽出物を抽出するために、酵素変換工程と有機溶媒による抽出工程の2段階に分けて抽出を行う。

【0052】

(酵素変換工程)

酵素変換工程は、本発明の抗癌剤に用いるゴボウシ抽出物の製造方法において重要な工程である。酵素変換工程は、ゴボウシに内在する酵素である α -グルコシダーゼにより、ゴボウシに含まれているアルクチインをアルクチゲニンに酵素変換する工程である。

【0053】

具体的には、上記工程で準備したゴボウシ切裁物を、適切な温度に保持することにより α -グルコシダーゼを作用させて、アルクチインからアルクチゲニンへの反応を進行させる。たとえば、切裁したゴボウシに水などの任意の溶液を加えて、30 付近の温度にて攪拌することなどにより、ゴボウシを任意の温度に保持することができる。

【0054】

アルクチゲニンおよびアルクチインをアルクチゲニン / アルクチイン = 0.7 ~ 1.3の重量比で含有するゴボウシ抽出物を得るためには、切裁したゴボウシを30 付近の温度、たとえば20 ~ 50 の間の温度に保持する。

【0055】

20 未満の場合は、加水分解が不十分となり、アルクチゲニンの重量比が下がり、所望のゴボウシ抽出物を効率的に得られなくなる。一方、50 より高温の場合は、酵素が失活し、アルクチゲニンの重量比が下がり、所望のゴボウシ抽出物を効率的に得られなくなる。

【0056】

また、保持時間は、上記温度において保持する限り特に限定されず、たとえば約30分保持させることができる。20 ~ 50 の間に保持することにより、保持時間にかかわらず、適切な量のアルクチインがアルクチゲニンに酵素変換され、アルクチゲニン : アルクチイン (重量比) が約1 : 1で含有するゴボウシ抽出物を得ることができる。

【0057】

(有機溶媒による抽出工程)

有機溶媒による抽出工程は、任意の適切な有機溶媒を使用して、ゴボウシからアルクチゲニンおよびアルクチインを抽出する工程である。すなわち、上記の酵素変換工程によりアルクチゲニンが高含量となった状態で、適切な溶媒を添加して、ゴボウシ抽出物を抽出する工程である。たとえば、ゴボウシ抽出物に適切な溶媒を添加して、適切な時間加熱攪拌してゴボウシ抽出物を抽出する。また、加熱攪拌以外にも、加熱還流、ドリップ式抽出、浸漬式抽出または加圧式抽出法などの当業者に公知の任意の抽出法を使用して、ゴボウシ抽出物を抽出することができる。

【0058】

アルクチゲニンは水難溶性であることから、有機溶媒を添加することにより、アルクチゲニンの収率を向上させることができる。有機溶媒は、任意の有機溶媒を使用することができる。たとえば、メタノール、エタノールおよびプロパノールなどのアルコール、並び

10

20

30

40

50

にアセトンを使用することができる。安全性の面を考慮すると、本発明の抗癌剤に用いるゴボウシ抽出物の製造方法では、有機溶媒としてエタノールを使用することが好ましい。

【0059】

加熱攪拌によってゴボウシ抽出物を抽出する場合、加熱攪拌は、任意の温度にて行うことができるが、アルクチゲニンおよびアルクチインをアルクチゲニン/アルクチイン=0.7~1.3の重量比で含有するゴボウシ抽出物を得るためには、80以上の温度、たとえば80~90の間の温度に保持する。

【0060】

また、加熱攪拌する時間は、上記温度において加熱攪拌する限り、特に限定されず、約30分間、たとえば30~60分間加熱攪拌することにより、溶媒中にゴボウシからアルクチゲニンおよびアルクチインを抽出させることができる。

10

【0061】

アルクチゲニンおよびアルクチインの収率は、加熱攪拌の時間が長いほど向上する。しかし、加熱攪拌の時間が長いと、不要な油脂類が多く溶け出し、濃縮工程の負荷が大きくなってしまふ。したがって、加熱攪拌の時間は、状況に応じて適宜決定すればよい。

【0062】

また、アルクチゲニンおよびアルクチインの収率は、エタノール量が多いほどアルクチゲニンおよびアルクチインの溶解度が高くなるため、収率も向上する。しかし、エタノール量が多いと、不要な油脂類も多く溶け出し、濃縮工程の負荷が大きくなってしまふ。したがって、投入量は、状況に応じて適宜決定すればよい。なおこの工程での加熱攪拌により、同時にゴボウシ抽出物を滅菌および殺菌することができる。

20

【0063】

(固液分離工程)

固液分離工程は、抽出の終わったゴボウシを抽出液から分離する工程である。固液分離は、当業者に公知の任意の方法を使用して行うことができる。固液分離法には、たとえば濾過法、沈降法および遠心分離法などがある。工業的には、遠心分離法が望ましい。

【0064】

(濃縮工程)

濃縮工程は、乾燥に先立ちゴボウシ抽出液から溶媒を除去する工程である。ゴボウシ抽出液からの溶媒の除去は、当業者に公知の任意の方法を使用して行うことができる。

30

【0065】

しかし、上記工程によって得られたゴボウシからの抽出液が、さらに高温に長時間曝されることがないようにすることが好ましい。

【0066】

たとえば、減圧濃縮法を使用することにより、高温に長時間曝されことなく、ゴボウシ抽出液を濃縮することができる。

【0067】

ゴボウシ抽出液の濃縮は、所望の濃度のゴボウシ抽出物を得ることができる濃度まで濃縮することができる。

【0068】

40

たとえば、以下の乾燥工程において乾燥を適正に行うことができる程度まで濃縮することが望ましい。また、以下の工程においてゴボウシ抽出物を乾燥させて粉末製剤にした場合に、適切な製剤特性が得られる濃度まで濃縮を行うことが望ましい。

【0069】

アルクチゲニンおよびアルクチインは、水難溶性であるため、アルクチゲニンおよびアルクチインが以下の乾燥工程における製造装置内に付着する量が多く、最終的な収率が大幅に低下する。そこで、製造装置にアルクチゲニンおよびアルクチインが付着するのを防止するために、この濃縮工程で得られたゴボウシ抽出液にデキストリンを添加することができる。デキストリンの添加量は、たとえば濃縮液の固形分に対して15~30%程度が望ましい。

50

【 0 0 7 0 】

(乾燥工程)

上記工程によって得られたゴボウシ抽出物を粉末状に仕上げる工程である。乾燥は、当業者に公知の任意の方法を使用して行うことができる。たとえば、乾燥法として、凍結乾燥および噴霧乾燥などが知られているが、実験室レベルであれば前者、量産レベルであれば後者を用いるのが一般的である。

【 0 0 7 1 】

以上の製造工程により、アルクチゲニンおよびアルクチインをアルクチゲニン / アルクチイン = 0.7 ~ 1.3 の重量比で含有するゴボウシ抽出物を得ることができる。このゴボウシ抽出物の製造方法は、20 ~ 50 の温度で酵素変換を行う工程を含まなければならないが、その他の工程の全てを含む必要はない。

10

【 0 0 7 2 】

また、以上の製造工程により、アルクチゲニンの濃度が高いゴボウシ抽出物を、安価にかつ簡便に得ることができる。したがって、この方法により得られたゴボウシ抽出物を用いることによって、本発明の抗癌剤を安価にかつ簡便に製造することができる。

【 0 0 7 3 】

また、以上の製造工程により得られるゴボウシ抽出物のアルクチゲニン濃度が高いため、従来のゴボウシ抽出物を用いた場合と比較して、抗癌剤の1日当たりの全体量を少なくすることができる。したがって、患者の負担を軽減させることができる。

【 0 0 7 4 】

20

なお、本発明は、ゴボウシを切裁する工程と、ゴボウシに内在する α -グルコシダーゼによりゴボウシに内在するアルクチインをアルクチゲニンに酵素変換する工程であって、前記酵素変換は、20 ~ 50 の温度で反応させる工程とを含む、アルクチゲニンおよびアルクチインをアルクチゲニン / アルクチイン = 0.7 ~ 1.3 の重量比 (1.0 ~ 1.9 のモル比) で含有するゴボウシ抽出物を製造する方法をも提供する。

【 0 0 7 5 】

また、本発明は、切裁する工程において、ゴボウシが0.85mm ~ 9.5mmの粒径に切裁される、上記のゴボウシ抽出物を製造する方法を提供する。

【 0 0 7 6 】

さらに、本発明は、ゴボウシに内在する α -グルコシダーゼの酵素活性が、ゴボウシ1g中0.4U以上である、上記のゴボウシ抽出物を製造する方法を提供する。

30

【 0 0 7 7 】

また、本発明は、酵素変換する工程の後に、有機溶媒を加えることにより、アルクチゲニンおよびアルクチインを含有する抽出物を抽出する工程を含む、上記のゴボウシ抽出物を製造する方法を提供する。

【 0 0 7 8 】

また、本発明は、有機溶媒がエタノールである、上記のゴボウシ抽出物を製造する方法を提供する。

【 0 0 7 9 】

また、本発明は、抽出する工程が約80 で抽出される、上記のゴボウシ抽出物を製造する方法を提供する。

40

【 0 0 8 0 】

さらに、本発明は、上記方法によって得られる、アルクチゲニン / アルクチインを0.7 ~ 1.3 の重量比で含有するゴボウシ抽出物を提供する。

【 0 0 8 1 】

さらに、本発明は、上記方法によって得られる、アルクチゲニン / アルクチインを0.7 ~ 1.3 の重量比で含有するゴボウシ抽出物を含有する抗癌剤を提供する。

【 0 0 8 2 】

本発明により、アルクチゲニンを1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有する、抗腫瘍効果のある抗癌剤の提供が可能となった。また本発明により、アルクチゲニンお

50

よびアルクチンを、アルクチゲニン / アルクチン = 0.7 ~ 1.3 (重量比) にて含有する抗癌剤の提供が可能となった。本発明の抗癌剤は、癌患者、たとえば膵臓癌患者に投与することで、安定した腫瘍の増殖抑制や抗腫瘍効果を期待できる。また、本発明の抗癌剤は、ゲムシタピンによる治療に不応答である膵臓癌を治療するための膵臓癌治療剤として用いることができる。

【0083】

また、以下の試験例7において、アルクチゲニンおよびアルクチンを含有する顆粒剤の毒性が非常に低いことが示された。したがって、本発明の抗癌剤は、非常に少ない副作用で高い抗癌効果を提供することができる。

【0084】

また、以下の試験例8および9において、アルクチゲニンが膵臓および肝臓の癌幹細胞に対し殺傷効果を有することが示された。このことから、アルクチゲニンは、固形癌に対して腫瘍本体だけでなく癌幹細胞にも作用して殺傷することにより抗癌作用を発揮することが示唆された。また、アルクチゲニンは、膵臓癌だけでなく他の癌の癌幹細胞も殺傷し、抗癌効果を有することが示された。したがって、本発明は、種々の癌を治療するための抗癌剤を提供する。

【0085】

また、本発明は、アルクチゲニンを含有する抗癌幹細胞剤をも提供する。抗癌幹細胞剤は、癌幹細胞を殺傷する効果を有する薬剤をいう。癌幹細胞は、癌細胞のうち幹細胞性を有する細胞をさす。

【0086】

本発明の抗癌幹細胞剤は、上述した本発明の抗癌剤と同様の構成であることができる。すなわち、抗癌幹細胞剤は、アルクチゲニンを1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有してもよい。また、抗癌幹細胞剤は、アルクチンをさらに含有してもよく、アルクチンを1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有してもよい。抗癌幹細胞剤は、アルクチゲニンおよびアルクチンを、アルクチゲニン / アルクチン = 0.7 ~ 1.3の重量比にて含有してもよい。アルクチゲニンおよびアルクチンは、アルクチゲニンおよびアルクチンを含有する植物由来であってもよく、たとえばゴボウシ由来であってもよい。

【0087】

以下の試験例8および9において、アルクチゲニンは、特に癌細胞の周囲の環境に近い栄養飢餓条件において癌幹細胞を選択的に殺傷する効果を有することが示された。したがって、本発明の抗癌幹細胞剤は、癌幹細胞を殺傷することにより、癌細胞の増殖を抑制することができるため、抗癌剤として好適に利用することができる。

【実施例】

【0088】

(試験例)

ゴボウシの酵素活性および酵素変換条件(温度と時間)が、アルクチゲニン / アルクチン(重量比)に及ぼす影響、すなわち両者の因果関係を検証した。

【0089】

(酵素活性の測定)

産地やロットが異なるゴボウシをウイレー氏粉碎機により粉碎し、このゴボウシ粉碎品0.1gを10mLの水で希釈し、試料溶液とした。

【0090】

基質溶液として、p-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド0.15gに水を加えて25mLに定容し、20mmol/L p-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド水溶液を調製した。0.1mol/L酢酸緩衝液1mLに20mmol/L

p-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド水溶液0.5mLを加えて、反応混液を調製し、37℃で約5分予備加熱を行った。

【0091】

反応混液に試料溶液0.5mL加えて37℃で15分反応させた後、反応停止液である0.2mol/L炭酸ナトリウム水溶液を2mL加えて反応を停止させた。この液の400nmにおける吸光度を測定し、酵素反応を行わないブランク溶液からの変化量から下式により酵素活性を求めた。
 酵素活性 (U/g) = (試料溶液の吸光度 - ブランク溶液の吸光度) × 4mL × 1 / 18.1 (p-ニトロフェノールの上記測定条件下でのミリモル分子吸光係数: cm² / μmol) × 1 / 光路長 (cm) × 1 / 反応時間 (分) × 1 / 0.5mL × 1 / 試料溶液濃度 (g / mL)

【0092】

表1に示すように各ゴボウシの酵素活性が0.12~8.23U/gであることを確認した。

【0093】

(試験例1)

酵素活性が0.12、0.27、0.40U/g (試料1~3) である切裁したゴボウシ1gに水7mLを加えて、酵素反応温度15℃、20℃の温度条件でそれぞれの反応温度での反応時間を30分に設定し、反応後エタノールを加え80℃で抽出を行い、得られた抽出物のアルクチゲニン及びアルクチンを定量し、アルクチゲニン / アルクチン重量比を求めた。結果を表1の比較例1~2、実施例1に示す。

【0094】

酵素活性が0.40U/gの試料3は、酵素反応温度20℃、反応時間30分で、アルクチゲニン / アルクチン (重量比) = 0.82のゴボウシ抽出物が得られた。

【0095】

一方、酵素反応温度15℃、反応時間30分では、アルクチゲニン / アルクチン (重量比) = 0.69であり、酵素反応温度は20℃以上であることが好ましい。

【0096】

また、酵素活性が0.40U/g未満の試料1及び2は、酵素反応温度20℃であってもアルクチゲニン / アルクチン (重量比) = 0.70以上を満たすことができないことから、ゴボウシの酵素活性は0.40U/g以上であることが好ましい。

【0097】

(試験例2)

酵素活性が4.03U/g (試料5) である切裁したゴボウシ1gに水7mLを加えて、酵素反応温度30℃、40℃、50℃、60℃の温度条件でそれぞれの反応温度での反応時間を15分、30分 (30℃と60℃のみ) に設定し、反応後エタノールで抽出を行い、得られた抽出物のアルクチゲニン及びアルクチンを定量し、アルクチゲニン / アルクチン重量比を求めた。

【0098】

結果を表1の実施例3に示す。酵素反応温度30℃、反応時間15分で、アルクチゲニン / アルクチン (重量比) = 0.7、酵素反応温度30℃、反応時間30分で、アルクチゲニン / アルクチン (重量比) = 1.0、酵素反応温度40℃、反応時間15分で、アルクチゲニン / アルクチン (重量比) = 1.2、酵素反応温度50℃、反応時間15分で、アルクチゲニン / アルクチン (重量比) = 1.2のゴボウシ抽出物が得られた。

【0099】

一方、酵素反応温度60℃、反応時間15分では、アルクチゲニン / アルクチン (重量比) = 0.4、酵素反応温度60℃、反応時間30分では、アルクチゲニン / アルクチン (重量比) = 0.5であった。以上のことから、酵素反応温度は60℃未満が好ましい。

【0100】

(試験例3)

酵素活性が1.42U/g (試料4) である切裁したゴボウシ1gに水を7mL加えて、酵素反応温度25℃の温度条件で反応時間を10分、30分に設定し、反応後エタノールで抽出を行い、得られた抽出物のアルクチゲニン及びアルクチンを定量し、アルクチゲニン / アルクチン重量比を求めた。

【0101】

結果を表1の実施例2に示す。酵素反応温度25℃、反応時間10分で、アルクチゲニン / アルクチン (重量比) = 0.74、同じく反応時間30分でアルクチゲニン / アルクチン (重

10

20

30

40

50

量比) = 0.85のゴボウシ抽出物が得られた。

以上のことから酵素活性1.42U/gであっても所望の結果を得ることができた。

【0102】

【表1】

			比較例1	比較例2	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5
試料			試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6	試料7
酵素活性(U/g)			0.12	0.27	0.40	1.42	4.03	7.82	8.23
アルクチゲニン/アルクチイン重量比	15℃	30分	0.26	0.50	0.69	--	--	--	--
	20℃	30分	0.23	0.60	0.82	--	--	--	--
	25℃	10分	--	--	--	0.74	--	--	--
		30分	--	--	--	0.85	--	--	--
	30℃	15分	--	--	--	--	0.70	--	--
		30分	--	--	--	--	1.00	0.93	0.89
	40℃	15分	--	--	--	--	1.20	--	--
		30分	--	--	--	--	--	--	--
	50℃	15分	--	--	--	--	1.20	--	--
		30分	--	--	--	--	--	--	--
	60℃	15分	--	--	--	--	0.40	--	--
		30分	--	--	--	--	0.50	--	--

【0103】

(実施例6 ゴボウシ抽出物の製造1)

ゴボウシ(酵素活性8.23U/g)を切裁し、9.5mmの篩を全通するものをさらに0.85mmの篩に通し、75%が残ることを確認した。このゴボウシ細切80kgを29~33℃に保温した水560Lに加えて30分間攪拌した。次いで、エタノール265Lを加えて85℃に昇温し、さらに60分間加熱還流した。この溶液を遠心分離し、ゴボウシ抽出液を得た。この操作を2回繰り返して得られた抽出液を合わせて、減圧濃縮し、抽出物固形分に対してデキストリン20%を加えて、噴霧乾燥した。アルクチゲニンおよびアルクチイン含量は、それぞれ6.2%および7.1%であり、アルクチゲニン/アルクチイン(重量比) = 0.89のゴボウシ抽出物粉末(デキストリン20%含有)が得られた。

【0104】

(実施例7 ゴボウシ抽出物の製造2)

ゴボウシ(酵素活性8.23U/g)を切裁し、9.5mmの篩を全通するものをさらに0.85mmの篩に通し、75%が残ることを確認した。このゴボウシ細切80kgを30~33℃に保温した水560Lに加えて30分間攪拌した後、エタノール265Lを加えて85℃に昇温し、さらに30分間加熱還流した。この溶液を遠心分離し、ゴボウシ抽出液を得た。この操作を2回繰り返して得られた抽出液を合わせて、減圧濃縮し、抽出物固形分に対してデキストリン20%を加えて、噴霧乾燥した。アルクチゲニンおよびアルクチイン含量は、それぞれ6.0%および6.8%であり、アルクチゲニン/アルクチイン(重量比) = 0.87のゴボウシ抽出物粉末(デキストリン20%含有)が得られた。

【0105】

(実施例8 ゴボウシ抽出物の製造3)

ゴボウシ(酵素活性7.82U/g)を切裁し、9.5mmの篩を全通するものをさらに0.85mmの篩に通し、75%が残ることを確認した。このゴボウシ細切80kgを30~32℃に保温した水560Lに加えて40分間攪拌した後、60分後にエタノール258Lを加えて85℃に昇温し、さらに30分間加熱還流した。この液を遠心分離し、ゴボウシ抽出液を得た。この操作を2回繰り返して得られた抽出液を合わせて、減圧濃縮し、抽出物固形分に対してデキストリン20%を加えて、噴霧乾燥した。アルクチゲニンおよびアルクチイン含量は、それぞれ6.2%および6.7%であり、アルクチゲニン/アルクチイン(重量比) = 0.93のゴボウシ抽出物粉末(デキストリン20%含有)が得られた。

【 0 1 0 6 】

(実施例9 ゴボウシ抽出物の製造4)

ゴボウシ（酵素活性7.82U/g）を切裁し、9.5mmの篩を全通するものをさらに0.85mmの篩に通し、75%が残ることを確認した。このゴボウシ細切80kgを30～32℃に保温した水560Lに加えて30分間攪拌した後、エタノール253Lを加えて85℃に昇温し、さらに40分間加熱還流した。この液を遠心分離し、得られた抽出液を得た。この操作を2回繰り返して得られた抽出液を合わせて、減圧濃縮し、抽出物固形分に対してデキストリン25%を加えて、噴霧乾燥した。アルクチゲニンおよびアルクチイン含量は、それぞれ6.4%および7.2%であり、アルクチゲニン/アルクチイン（重量比）=0.89のゴボウシ抽出物粉末（デキストリン25%含有）が得られた。

10

【 0 1 0 7 】

【表 2】

		実施例6	実施例7	実施例8	実施例9
ゴボウシ	酵素活性	8.23	8.23	7.82	7.82
切裁工程	粒径(mm)	0.85-9.5	0.85-9.5	0.85-9.5	0.85-9.5
酵素変換工程	温度(℃)	29～33℃	30～33℃	30～32℃	30～32℃
	時間(分)	30分	30分	40分	30分
抽出工程	溶媒	エタノール	エタノール	エタノール	エタノール
	温度(℃)	85℃	85℃	85℃	85℃
	時間(分)	60分	30分	30分	40分
固液分離工程		遠心分離法	遠心分離法	遠心分離法	遠心分離法
濃縮工程		減圧濃縮	減圧濃縮	減圧濃縮	減圧濃縮
乾燥工程		噴霧乾燥	噴霧乾燥	噴霧乾燥	噴霧乾燥
アルクチゲニン/アルクチイン(重量比)		0.89	0.87	0.93	0.89

20

【 0 1 0 8 】

上記の実施例6～9の結果から、酵素変換工程において、およそ30℃において酵素変換することにより、アルクチゲニン：アルクチイン（重量比）=約1：1の含有量のゴボウシ抽出物が得られることが分かった。通常、酵素による反応は、温度および時間に依存的に反応が進行するが、この温度であれば酵素変換時間にかかわらず、アルクチゲニン：アルクチイン（重量比）=約1：1の含有量のゴボウシ抽出物が得られることが分かった。

30

【 0 1 0 9 】

また、上記の実施例6～9の結果から、加熱還流工程において、およそ85℃に温度を上昇させて加熱還流することにより、アルクチゲニン：アルクチイン（重量比）=約1：1の含有量のゴボウシ抽出物が得られることが分かった。通常、加熱還流して抽出物を得る場合、抽出物中の含有物の量は、温度および時間に依存して変化するが、この温度であれば加熱還流時間にかかわらず、アルクチゲニン：アルクチイン（重量比）=約1：1の含有量のゴボウシ抽出物が得られることが分かった。

40

【 0 1 1 0 】

(実施例10 ゴボウシ抽出物粉末配合顆粒剤)

(1) 実施例7のゴボウシ抽出物粉末	33.3%
(2) 乳糖	65.2%
(3) ヒドロキシプロピルセルロース	1.5%
合計	100%

【 0 1 1 1 】

(製造方法)

「日局」製剤総則、顆粒剤の項に準じて顆粒剤を製造する。すなわち上表に記載の(1

50

）～（３）までの成分をとり、顆粒状に製した。これを1.5 g ずつアルミラミネートフィルムに充填し、1包あたりゴボウシ抽出物粉末を0.5 g 含有する顆粒剤を得た。

【 0 1 1 2 】

（実施例11 ゴボウシ抽出物粉末配合顆粒剤）

（１）実施例7のゴボウシ抽出物粉末	66.7 %
（２）乳糖	30.3 %
（３）ヒドロキシプロピルセルロース	3.0 %
合計	100 %

【 0 1 1 3 】

（製造方法）

「日局」製剤総則、顆粒剤の項に準じて顆粒剤を製造する。すなわち上表に記載の（１）～（３）までの成分をとり、顆粒状に製した。これを3.0 g ずつアルミラミネートフィルムに充填し、1包あたりゴボウシ抽出物粉末を2 g 含有する顆粒剤を得た。

10

（実施例12 ゴボウシ抽出物粉末配合錠剤）

（１）実施例7のゴボウシ抽出物粉末	37.0 %
（２）結晶セルロース	45.1 %
（３）カルメロースカルシウム	10.0 %
（４）クロスボピドン	3.5 %
（５）含水二酸化ケイ素	3.4 %
（６）ステアリン酸マグネシウム	1.0 %
合計	100 %

20

【 0 1 1 4 】

（製造方法）

「日局」製剤総則、錠剤の項に準じて錠剤を製する。すなわち上表に記載の（１）～（６）成分をとり、錠剤を得た。

【 0 1 1 5 】

（試験例4）

実施例10の顆粒剤を用いて膵臓癌に対する効果を試験した。

【 0 1 1 6 】

病理組織学的に腺癌（腺扁平上皮癌を含む）であることが確認され、前治療として1年3 か月の間Gemcitabine+S-1療法を行いBest responseが部分奏効（PR：Partial Response）であった、最終的にGemcitabine+S-1療法に抵抗性となり、PD（Progressive disease）となった患者（53歳、男性）を対象とした。この患者に対し、実施例10の顆粒剤7.5 g（5包）（ゴボウシ抽出物粉末2.5gを含有する）を、1日1回朝食後、連日経口投与した。

30

【 0 1 1 7 】

なお、本試験例で用いた顆粒剤に含まれるゴボウシ抽出物粉末1gには、アルクチゲニン59.4mgおよびアルクチイン68.5mgが含まれる。すなわち、患者に投与した1日当たりのアルクチゲニンは148.5mgであり、アルクチインは171.25mgである。

【 0 1 1 8 】

図1～3は、この患者における顆粒剤投与前（A）、投与開始1か月後（B）、2か月後（C）および3か月後（D）の胸腹部造影CTの画像を示す図である。これらの画像により、経時的に「固形がんの治療効果判定のための新ガイドライン（RECIST guideline（version 1.1））」による腫瘍縮小効果判定を行った。その結果、図2および図3に矢印で示すように、腫瘍縮小効果が確認された。一方、上記患者において、実施例10の顆粒剤の投与後に重篤な副作用は見られなかった。

40

【 0 1 1 9 】

さらに、顆粒剤投与前後の腫瘍マーカーCA19-9およびCEAの量を検査した。その結果、表3に示すように、顆粒剤投与後の腫瘍マーカーCA19-9およびCEAの低下が確認された。

【 0 1 2 0 】

50

【表 3】

	投与前	投与 1 か月後	投与 2 か月後	投与 3 か月後
CA19-9 (U/mL)	69.7	172.5	123	100.6
CEA (ng/mL)	66.4	224.1	114.8	98.3

【0121】

したがって、本発明の抗癌剤は、膵臓癌に対して効果的であることが示された。特に、ゲムシタピンによる治療に不応答である膵臓癌に対して効果があることが示された。本発明の構成を投与したときに膵臓癌に対し効果があることは、従来は知られていなかったことであり、また実際に人に対して投与してみなければ容易に想到し得ないことである。

10

【0122】

また、本発明の抗癌剤は、膵臓癌だけでなく大腸癌など、乏血管性であって低酸素・低栄養状態の癌などにも有効性が期待できる。

【0123】

(試験例5)

前治療としてゲムシタピン療法を行い不応答であった膵臓癌患者3名を対象として、実施例10の顆粒剤3g(ゴボウシ抽出物粉末1gを含有する)を、1日1回朝食後、連日経口投与した。すなわち、本試験例において患者に投与した1日当たりのアルクチゲニンは59.4mgであり、アルクチインは68.5mgであった。

20

【0124】

その結果、これらの患者では、投与開始1~2か月間は腫瘍の増大が認められなかったものの、最終的にはPDと判定された。すなわち、腫瘍の縮小効果および腫瘍マーカー低下は確認されなかった。また、いずれの患者においても、上記顆粒剤の投与後に重篤な副作用は見られなかった。

【0125】

(実施例12 刻み、冷浸抽出、エタノール添加によるゴボウシエキスの製造)

ゴボウシ細切200gを水(22℃)1Lに加えて1時間攪拌した後、エタノール0.45Lを加えて更に1時間加熱還流した。ガーゼ4枚(金網100mesh)でろ過し、30%エタノール0.5Lで洗浄し、合せた抽出液(1.5L)を凍結乾燥した。このようにして得た、生薬の刻みを冷浸抽出したゴボウシエキスは、アルクチイン及びアルクチゲニン含量がそれぞれ、13.3%及び11.4%で、アルクチゲニン/アルクチイン(重量比)=0.86であった。

30

【0126】

(試験例6: 腫瘍モデル動物における抗腫瘍性の評価)

(試験方法)

腫瘍モデル動物は、ドナーとなるヌードマウス(BALB-cAJnu/nu;日本クレア)の背皮下にヒトすい臓がん細胞株CAPAN-1もしくは、PSN-1を播種し、得られたドナーマウスの腫瘍塊をレシピエントマウスの背皮下に移植することによって作製した。アルクチゲニン(AG)、アルクチイン(A)およびゴボウシエキス(実施例12)は、DMSOに10mg/mlの濃度で溶解したものを生理食塩水で希釈し、マウス1匹あたり50μgを1週間に5回、胃内に経口投与した。抗腫瘍性は、背皮下の腫瘍塊のサイズを経時的に計測することによって評価した。

40

【0127】

投与開始後1ヶ月で、コントロールに比べて薬剤投与群に顕著な腫瘍の増殖抑制効果が認められた。また、精製アルクチゲニンの投与群においても抗腫瘍効果が得られたが、前駆体であるアルクチインをともに含んだゴボウシエキス(実施例12)の方が、より強い抗腫瘍効果が見られた(図4および5)。この結果から、アルクチゲニン/アルクチイン(重量比)=0.7~1.3のゴボウシエキスは、より高い抗腫瘍活性を示すことが確認できた。

【0128】

(試験例7: 用量制限毒性(dose limiting toxicity: DLT)の発現頻度)

前治療としてゲムシタピン療法を行い不応答であった膵臓癌患者15名を対象として、用

50

量制限毒性の発現頻度を調査するためアルクチゲニン含有顆粒剤の第I相試験を行った。この15名には、所定の用量のアルクチゲニン含有顆粒剤を1日1回朝食後、連日経口投与した。この15名のうち3名には、1回あたり、実施例10の顆粒剤3g（ゴボウシ抽出物粉末1g、すなわちアルクチゲニン59.4mgおよびアルクチン68.5mgを含有する）を投与した。15名のうち別の3名には、1回あたり、実施例10の顆粒剤7.5g（ゴボウシ抽出物粉末2.5g、すなわちアルクチゲニン148.5mgおよびアルクチン171.25mgを含有する）を投与した。さらに別の9名には、1回あたり、実施例10の顆粒剤12g（ゴボウシ抽出物粉末4g、すなわちアルクチゲニン237.6mgおよびアルクチン274mgを含有する）を投与した。

【0129】

その結果、対象患者15名のうち、用量制限毒性の発現頻度は0であった。具体的には、
 10
 脾癌患者に対するアルクチゲニン含有顆粒剤の第I相試験での主なGrade 3以上の有害事象は、GGTの上昇、高血糖、ALPの上昇、血中ビリルビンの上昇で、重篤な有害事象は認めなかった。

【0130】

【表4】

アルクチゲニン含有顆粒剤の第I相試験での有害事象
 (n=15, 全コース期間中)

項目	G1	G2	G3	G4	%G 3-4
自他覚症状					
下痢	3	1	0	0	0
悪心	2	2	0	—	0
胃痛	1	0	0	—	0
嘔吐	3	0	0	0	0
食欲不振	3	4	0	0	0
臨床検査値					
白血球減少	5	0	0	0	0
好中球数減少	1	0	0	0	0
貧血	11	2	0	0	0
血小板数減少	3	0	0	0	0
血中ビリルビン増加	1	1	1	0	6.67
AST 増加	9	2	0	0	0
ALT 増加	6	1	0	0	0
ALP 増加	10	1	1	0	6.67
GGT 増加	4	0	7	0	46.7
Cr 増加	0	1	0	0	0
高血糖	5	6	4	0	26.7

【0131】

これらの結果から、本実施例の顆粒剤は毒性が非常に低く、安全性が高いことが分かった。したがって、本発明は、副作用がより少ない抗癌剤を提供することが可能であることが示された。

【0132】

（試験例8：脾臓癌幹細胞に対する効果）

次に、癌に対する様々な治療抵抗性や再発・転移巣の出現に深く関与すると考えられる癌幹細胞様集団（CSCs：Cancer Stem-like cells）に対するアルクチゲニンの効果を調べた。

【0133】

（培地および試薬調製）

グルコース含有培地は、4.75gダルベッコ変法イーグル培地2（日水製薬）を水に溶解し、12.5ml 1M HEPES pH7.4（DOJINDO、342-01375）を加えて滅菌後、18.5ml 10% NaHCO_3 、

10

20

30

40

50

10ml L-glutamine (SIGMA)、5ml Anti-Anti (Life technologies)、5ml MEM NON-ESSENTIAL AMINO ACID SOLUTION (SIGMA)、56 で30分温浴にて非動化させた50ml FETAL BOVINE SERUM (biowest) を加え、最終的に500mlにして作製した。

【 0 1 3 4 】

グルコース阻害培地は、グルコース含有培地に終濃度20mMの2-Deoxy-Glucose (2-DG) (東京化成工業) を添加して作製した。

【 0 1 3 5 】

3 μ Mアルクチゲニンを含む培地は、グルコース含有培地またはグルコース阻害培地に、終濃度3 μ Mのアルクチゲニン (クラシエ製薬) を添加して作製した。

【 0 1 3 6 】

FACSバッファは、10g Bovine serum albumin Protease free (和光純薬工業) を1LのPBS(-)に溶解し、終濃度0.1%のアジ化ナトリウムを加え、濾過滅菌にて作製した。

【 0 1 3 7 】

FACS分析用の蛍光標識抗体は、CD44(338803または338807, biolegend), CD24(311117, biolegend), ESA(324205, biolegend), c-Met(11-8858, e-bioscience)を使用した。また染色行程は、製品添付のデータシートに従い行った。

【 0 1 3 8 】

(試験方法および結果)

膵臓癌細胞PANC-1 (ATCC No. CRL-1469) をグルコース含有培養培地に播種して一晩インキュベートした後、グルコース含有培地、グルコース阻害培地、3 μ Mアルクチゲニンを含むグルコース含有培地および3 μ Mアルクチゲニンを含むグルコース阻害培地のそれぞれにおいて24時間培養した。細胞を回収した後、定法にしたがってPI染色 (死細胞染色) および癌幹細胞マーカー染色を行い、フローサイトメトリー (FACS) にて解析を行った。マーカーとしては、膵臓癌の幹細胞マーカーとして報告のあるCD44、CD24およびESA(CD326) の3重陽性、またはCD44陽性、c-Met強陽性の2重陽性を用いた。

【 0 1 3 9 】

PI染色および癌幹細胞マーカー (CD44⁺、CD24⁺およびESA⁺(CD326) の3重陽性) の染色結果を図6に示す。PI染色の結果、細胞の生存率は、グルコース含有条件では78.20%、グルコース阻害条件では68.53%、およびグルコース含有条件における3 μ Mアルクチゲニン存在下では69.50%であったのに対し、グルコース阻害条件での3 μ Mアルクチゲニン存在下では生存率が35.71%であった。

【 0 1 4 0 】

また、癌幹細胞マーカー染色の結果、膵臓癌幹細胞を指し示すCD44⁺ESA⁺CD24⁺細胞の割合 (生存数) は、全分析細胞中の、グルコース含有条件では4.41% (441個)、グルコース阻害条件では6.51% (651個)、およびグルコース含有条件における3 μ Mアルクチゲニン存在下では5.01% (501個) であったのに対し、グルコース阻害条件での3 μ Mアルクチゲニン存在下では0.98% (98個) であった。したがって、アルクチゲニンは、グルコース飢餓条件において膵臓癌幹細胞を殺傷する効果を有することが示された。

【 0 1 4 1 】

PI染色および癌幹細胞マーカー (CD44⁺、c-Met^{High} の2重陽性) の染色結果を図7に示す。PI染色の結果、細胞の生存率は、グルコース含有条件では84.70%、グルコース阻害条件では88.80%、およびグルコース含有条件における3 μ Mアルクチゲニン存在下では83.30%であったのに対し、グルコース阻害条件での3 μ Mアルクチゲニン存在下では生存率が27.50%であった。

【 0 1 4 2 】

強力な造腫瘍能を指標とした膵臓癌幹細胞の新たなマーカーとして報告が相次いでいるCD44陽性c-Met強陽性(CD44⁺、c-Met^{High})細胞の膵臓がん細胞株における陽性割合 (生存数) は、グルコース含有条件では0.63% (38個)、グルコース阻害条件では0.78% (47個)、およびグルコース含有条件における3 μ Mアルクチゲニン存在下では0.52% (31個) であったのに対し、グルコース飢餓条件での3 μ Mアルクチゲニン存在下では0.22% (13個) で

10

20

30

40

50

あった。したがって、アルクチゲニンは、グルコース飢餓条件において、これらの幹細胞マーカーを発現する膵臓癌幹細胞に対しても、これを殺傷する効果を有することが示された。

【0143】

(試験例9：膵臓癌幹細胞に対する既存化学療法剤との比較試験)

アルクチゲニンと膵臓癌に対する既存の化学療法剤の一つであるシスプラチンの膵臓がん幹細胞に対する殺傷効果の比較を行った。

【0144】

(培地および試薬調製)

グルコース含有培地は、4.75gダルベッコ変法イーグル培地2(日水製薬)を水に溶解し、12.5ml 1M HEPES pH7.4(DOJINDO、342-01375)を加えて滅菌後、18.5ml 10% NaHCO_3 、10ml L-glutamine(SIGMA)、5ml Anti-Anti(Life technologies)、5ml MEM NON-ESSENTIAL AMINO ACID SOLUTION(SIGMA)、56 で30分温浴にて非動化させた50ml FETAL BOVINE SERUM(biowest)を加え、最終的に500mlにして作製した。

【0145】

グルコース阻害培地は、グルコース含有培地に終濃度15mMの2-Deoxy-Glucose(2-DG)(東京化成工業)を添加して作製した。

【0146】

4 μM アルクチゲニンを含む培地は、グルコース含有培地またはグルコース阻害培地に、終濃度4 μM のアルクチゲニン(クラシエ製薬)を添加して作製した。

【0147】

(試験方法および結果)

膵臓癌細胞Capan-1(ATCC No. HTB-79)をグルコース含有培養培地に播種して一晚インキュベートした後、グルコース含有培地、グルコース阻害培地、4 μM アルクチゲニンを含むグルコース含有培地および4 μM アルクチゲニンを含むグルコース阻害培地、または7 μM シスプラチン(CDDP：和光純薬工業)のそれぞれにおいて24時間培養した。細胞を回収した後、定法にしたがってPI染色(死細胞染色)および癌幹細胞マーカー染色を行い、フローサイトメトリー(FACS)にて解析を行ったマーカーとしては、膵臓癌の幹細胞マーカーとして報告のあるCD44、CD24およびESA(CD326)の3重陽性を用いた。

【0148】

PI染色および癌幹細胞マーカーの染色結果を図8に示す。PI染色の結果、細胞の生存率は、グルコース含有条件では67.57%、グルコース阻害条件では79.10%、およびグルコース含有条件における4 μM アルクチゲニン存在下では72.80%であったのに対し、グルコース阻害条件での4 μM アルクチゲニン存在下では生存率が48.73%であり、シスプラチン処理では58.08%であった。

【0149】

また、癌幹細胞マーカー染色の結果、膵臓癌幹細胞を指し示すCD44⁺ESA⁺CD24⁺細胞の割合(生存数)は、全細胞中で分析すると、グルコース含有条件では0.87%(65個)、グルコース阻害条件では1.40%(105個)、およびグルコース含有条件における4 μM アルクチゲニン存在下では1.04%(78個)であったのに対し、グルコース阻害条件での4 μM アルクチゲニン存在下では0.24%(18個)であり、シスプラチン処理では1.17%(88個)であった。一方で、生存細胞中で分析すると、グルコース含有条件では1.28%、グルコース阻害条件では1.77%、およびグルコース含有条件における4 μM アルクチゲニン存在下では1.43%であったのに対し、グルコース阻害条件での4 μM アルクチゲニン存在下では0.50%であり、シスプラチン処理では2.02%に上昇していた。したがって、アルクチゲニンは、グルコース飢餓条件において、シスプラチンで殺傷することが困難なCD44⁺ESA⁺CD24⁺陽性膵臓癌幹細胞を殺傷する効果を有することが示された。

【0150】

試験例8および9の結果から、アルクチゲニンは、体内において癌細胞が置かれている環境に近い栄養飢餓条件において、癌幹細胞様集団に対し殺傷効果を有することが強く示唆

10

20

30

40

50

された。また、アルクチゲニン、また、アルクチゲニンは、腫瘍本体に作用して癌細胞の増殖を抑制する効果だけでなく、癌細胞を供給し腫瘍組織を再構築する能力を有する癌幹細胞に作用してこれを殺傷する効果をも有することが強く示唆された。

【0151】

また、試験例7におけるアルクチゲニンを含む顆粒剤は、非常に低い毒性を示した。アルクチゲニンは、栄養飢餓条件において殺傷効果を有すること、および癌本体の細胞だけでなく癌幹細胞にも作用することによって、正常な細胞に対する影響を低下させることができるため、低い毒性を獲得している可能性が示唆される。したがって、本発明は、少ない副作用で高い抗癌作用を有する抗癌剤を提供することが可能である。

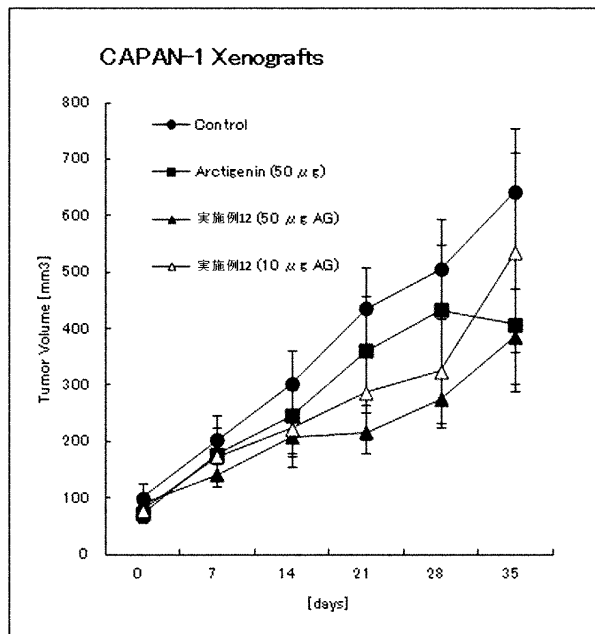
【産業上の利用可能性】

【0152】

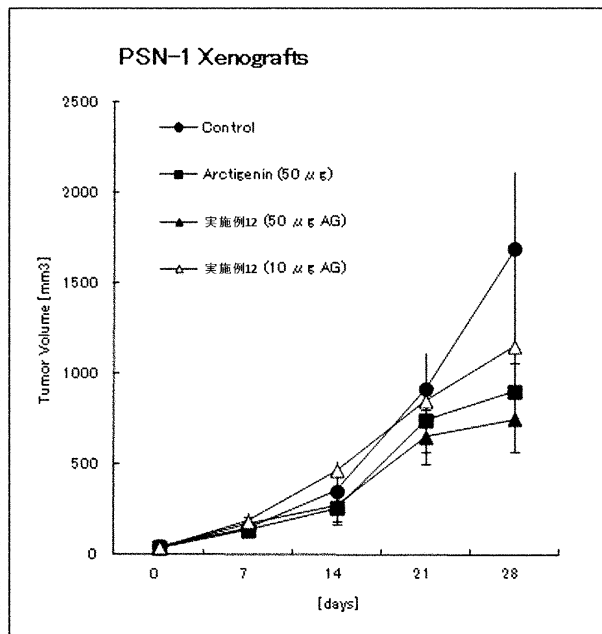
本発明は、抗癌剤、特に膵臓癌治療剤に好適に利用することができる。

10

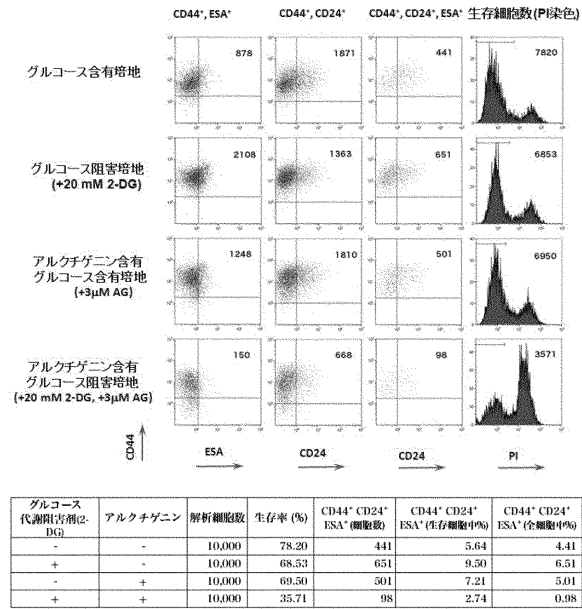
【図4】



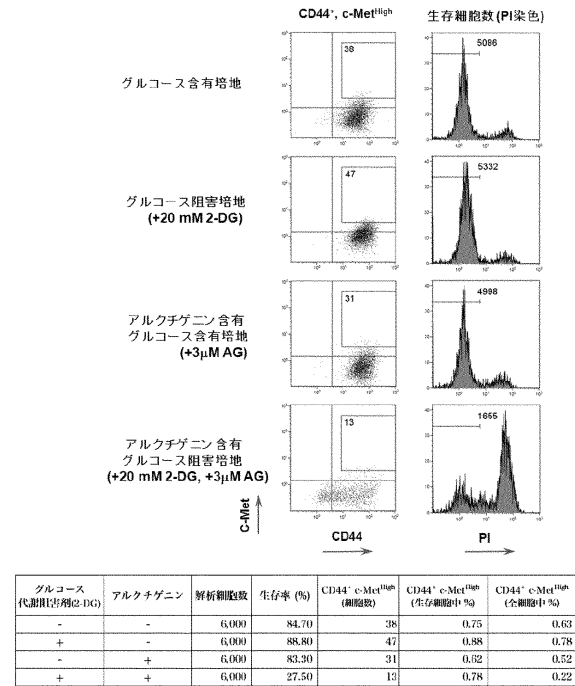
【図5】



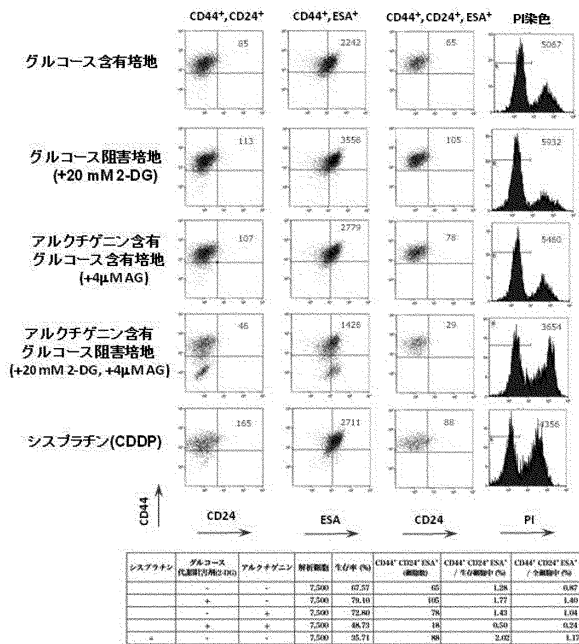
【図 6】



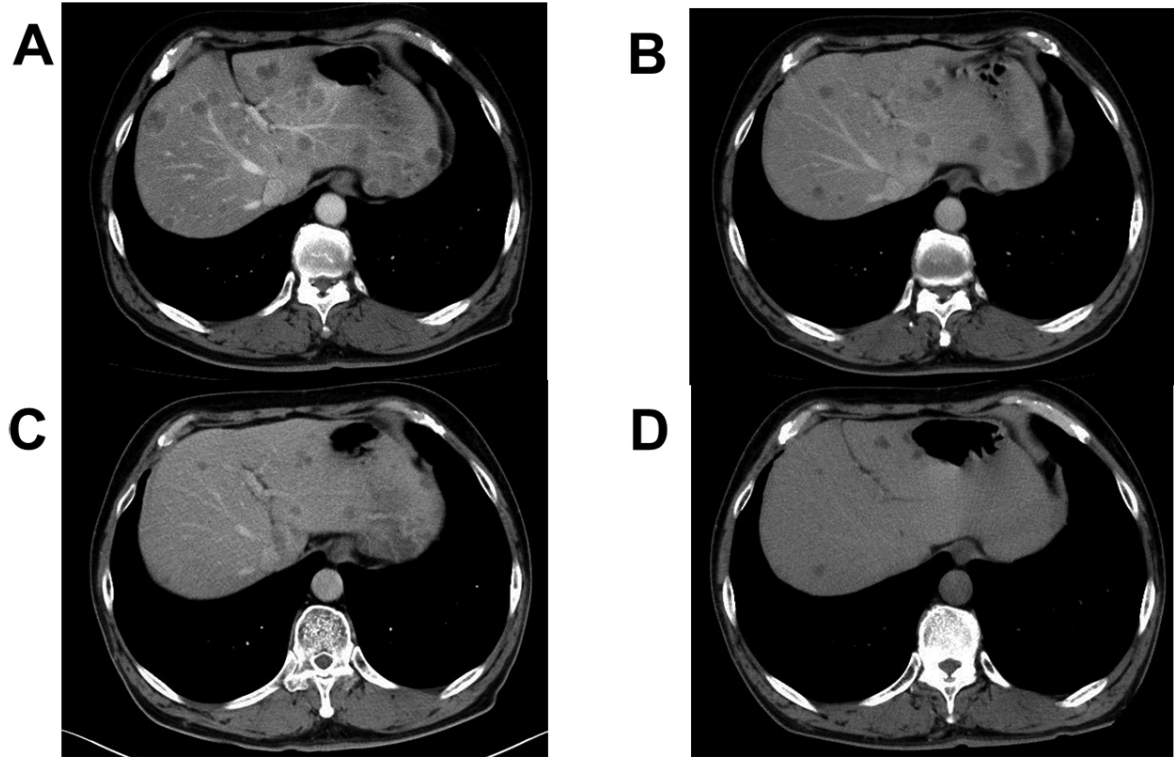
【図 7】



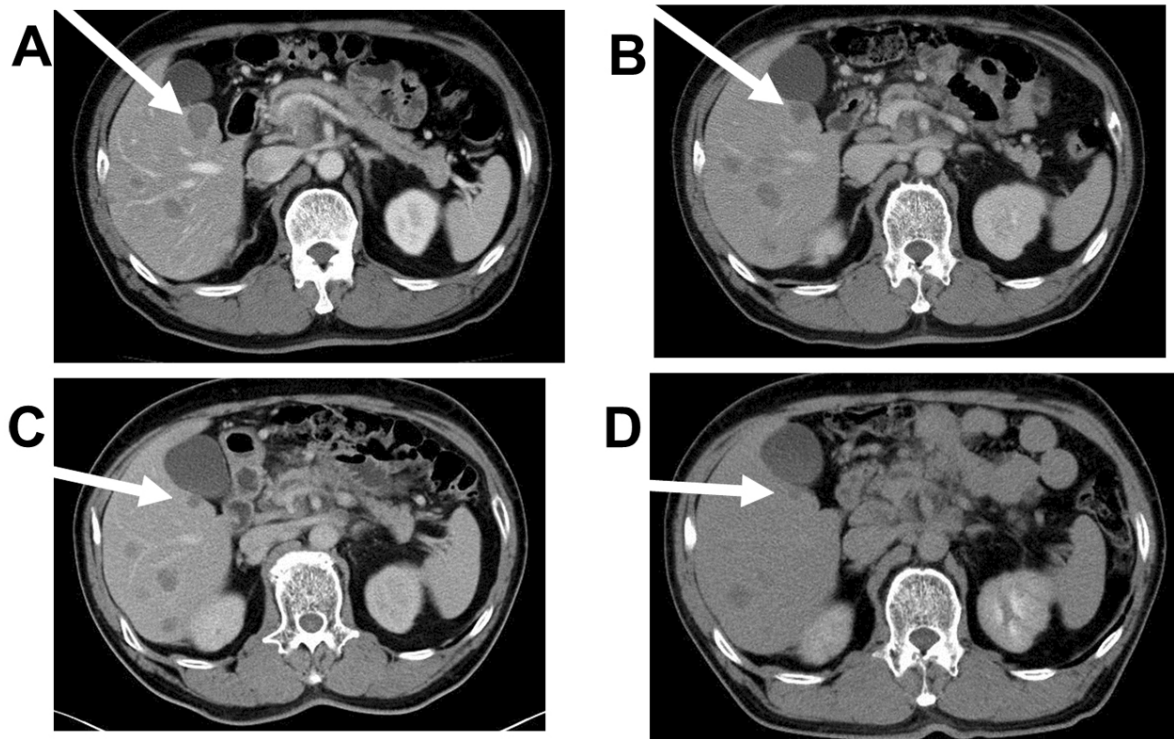
【図 8】



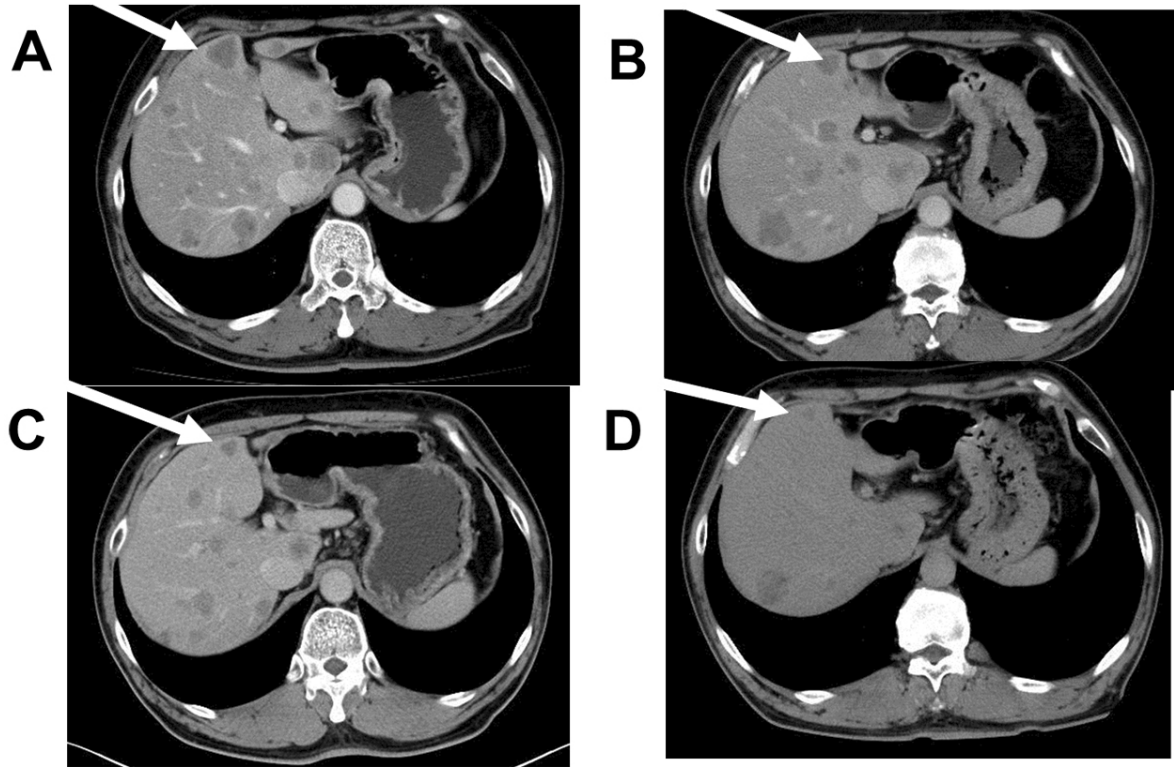
【図 1】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

- (72)発明者 江角 浩安
千葉県柏市柏の葉 6 - 5 - 1 国立がん研究センター東病院内
- (72)発明者 池田 公史
千葉県柏市柏の葉 6 - 5 - 1 国立がん研究センター東病院内
- (72)発明者 三好 千香
千葉県柏市柏の葉 6 - 5 - 1 国立がん研究センター東病院内
- (72)発明者 門田 重利
富山県富山市五艘 1 3 5 7 - 1 7
- (72)発明者 大窪 敏樹
富山県高岡市鐘紡町 3 番 1 号クラシエ製薬株式会社内
- (72)発明者 与茂田 敏
富山県高岡市鐘紡町 3 番 1 号クラシエ製薬株式会社内
- (72)発明者 布施 貴史
富山県高岡市鐘紡町 3 番 1 号クラシエ製薬株式会社内
- (72)発明者 川島 孝則
富山県高岡市鐘紡町 3 番 1 号クラシエ製薬株式会社内
- (72)発明者 千葉 殖幹
富山県高岡市鐘紡町 3 番 1 号クラシエ製薬株式会社内

審査官 伊藤 清子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 0 / 1 0 9 9 6 1 (WO , A 1)

- AWALE, S. et al , Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation , Cancer Res. , 2 0 0 6 年 , Vol.66, No.3 , p.1751-1757
- BOECK, S. et al , Second-line chemotherapy with pemetrexed after gemcitabine failure in patients with advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II trial , Ann. Oncol. , 2 0 0 7 年 , Vol.18, No.4 , p.745-751
- MUELLER, M.T. et al , Combined targeted treatment to eliminate tumorigenic cancer stem cells in human pancreatic cancer , Gastroenterology , 2 0 0 9 年 , Vol.137, No.3 , p.1102-1113
- LI, Y. et al , Implications of cancer stem cell theory for cancer chemoprevention by natural dietary compounds , J. Nutr. Biochem. , 2 0 1 1 年 , Vol.22, No.9 , p.799-806
- YOO, J.H. et al , Lignans inhibit cell growth via regulation of Wnt/beta-catenin signaling , Food Chem. Toxicol. , 2 0 1 0 年 , Vol.48, No.8-9 , p.2247-2252
- ZHOU, J. et al , Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance , Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 2 0 0 7 年 , Vol.104, No.41 , p.16158-16163 , Fig.1の訂正ページを添付
- 三好千香 他 , Cytotoxic effects of arctigenin on pancreatic tumor growth , 日本癌学会学術総会記事 , 2 0 0 9 年 8 月 3 1 日 , Vol.68th , P.464 , P-1091

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 1 / 3 4 1
A 6 1 K 3 1 / 7 0 3 4
A 6 1 K 3 6 / 0 0
A 6 1 K 3 6 / 2 8
A 6 1 P 3 5 / 0 0
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)