

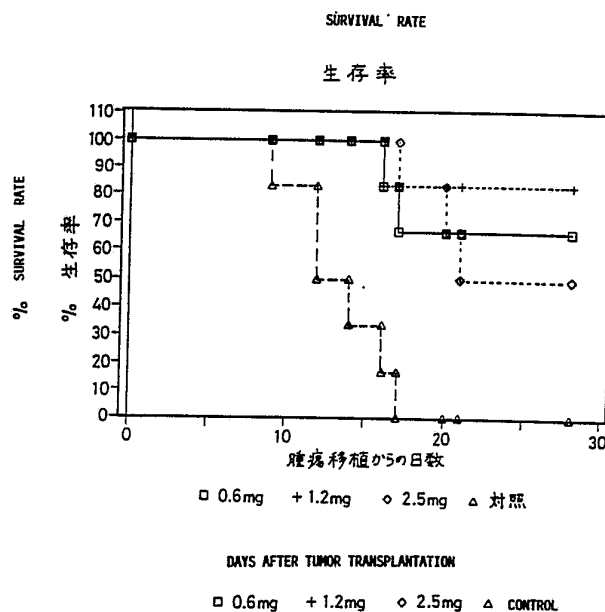


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 A61K 35/78, 35/78	A1	(11) 国際公開番号 WO 92/00086 (43) 国際公開日 1992年1月9日 (09. 01. 1992)
(21) 国際出願番号 PCT/JP91/00864 (22) 国際出願日 1991年6月27日 (27. 06. 91) (30) 優先権データ 特願平2/171978 1990年6月27日 (27. 06. 90) JP (71) 出願人 ; および (72) 発明者 大久保新也 (OKUBO, Shinya) [JP/JP] 〒770 徳島県徳島市機町2丁目6番地の1 Tokushima, (JP) 佐藤光信 (SATO, Mitsunobu) [JP/JP] 〒770 徳島県徳島市八万町下福万187-10 Tokushima, (JP) 姫野國祐 (HIMENO, Kunisuke) [JP/JP] 〒770 徳島県徳島市八万町下福万188-18 Tokushima, (JP) (74) 代理人 弁理士 内田亘彦, 外 (UCHIDA, Nobuhiko et al.) 〒110 東京都台東区上野1丁目18番11号 西楽堂ビル7階 梓特許事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US.		
添付公開書類 国際調査報告書		

(54) Title : ANTITUMOR AGENT

(54) 発明の名称 抗癌剤



(57) Abstract

An antitumor agent comprising a substance extracted from the seeds of *Aeginetia indica* L. and having an activity of inducing interleukin-2 and interferon- γ and exhibiting such an excellent antitumor action that all of the six control mice (Δ) died of tumor 17 days after tumor transplantation, whereas each of the mice to which this agent had been administered intraperitoneally in a dose of 0.6 mg/kg (), 1.2 mg/kg (+) or 2.5 mg/kg () at intervals of two days after tumor transplantation had an increased survival rate.

(57) 要約

本発明の抗癌剤は、ナンバンギセルの種子から抽出され、インターロイキン-2 及びインターフェロン- γ 誘起能を有する抽出物からなるものであり、第1図において、腫瘍移植17日目後には、投与を受けないマウス (Δ 印) はすべてのマウス (6匹) が腫瘍死したのに対して、腫瘍移植の同日から2日毎に、0.6mg/kg ($\square$ 印)、1.2 mg/kg (+印)、2.5 mg/kg ($\diamond$ 印) を腹腔内に投与したマウスはいずれも生存率が上昇していることが示されているように、優れた抗癌作用を示すものである。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	ES	スペイン	ML	マリ
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	MN	モンゴル
BB	バルバドス	FR	フランス	MR	モーリタニア
BE	ベルギー	GA	ガボン	MW	マラウイ
BF	ブルキナ・ファソ	GI	ギニア	NL	オランダ
BG	ブルガリア	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	RO	ルーマニア
CA	カナダ	IT	イタリア	SD	スーダン
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	SE	スウェーデン
CG	コンゴ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SN	セネガル
CH	スイス	KR	大韓民国	SU	ソビエト連邦
CI	コート・ジボアール	LI	リヒテンシュタイン	TD	チャード
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TG	トーゴ
CS	チェコスロバキア	LU	ルクセンブルグ	US	米国
DE	ドイツ	MC	モナコ		
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		

1

明細書

抗癌剤

技術分野

本発明は、ナンバンギセルの種子より抽出されるインター
ロイキン-2、及びインターフェロン- γ 誘起能を有する抽
出物からなる抗癌剤に関する。

背景技術

インターロイキンまたインターフェロン誘起剤は、ヒト、
動物の細胞に作用して、インターロイキン (IL)、インタ
ーフェロン (IFN) を誘起する物質である。このような作
用を有する天然物質は種々知られており、例えば、漢方薬「
当帰」を熱水で処理し、その抽出液から IFN 誘起活性を有
する物質が単離され (特開昭 53-32107 号公報)、また
漢方薬「桑白皮」から同様に IFN 誘起活性物質が単離さ
れて (特開昭 53-99313 号公報) いる。

ナンバンギセル (*Aeglnetia Indica* L;AIL) は、強壯剤と
して知られ、ハマウツボ科ナンバンギセル属の 1 年生無葉緑
植物で、ススキ、ミョウガ、サトウキビ等の根に寄生し、果
実のうちに無数のほこりのように細かい種子を入れている。
(広川書店、総合薬用植物、第 106~107 頁、昭和 11
年発行)

本発明者等は、このナンバンギセルの種子からの抽出物質
が、著しい IL-2、及び IFN- γ 誘起活性を有する成分
を有し、かつ副作用を有しないことを見出したが、本発明は
、このナンバンギセルの種子からの抽出物からなる抗癌剤の

1 提供を課題とする。

発明の開示

本発明の抗癌剤は、ナンバンギセルの種子から抽出されるインターロイキン-2、及びインターフェロン- γ 誘起能
5 を有する抽出物からなることを特徴とする。

このインターロイキン-2、及びインターフェロン- γ 誘起剤は、ナンバンギセルの種子より

①、蒸溜水、特に蒸溜水がリン酸緩衝生理食塩水により抽出されるか、また、

1 0 ②、ナンバンギセルの種子より水飽和ブタノールにより抽出され、得られた水層をプロナーゼ処理し、その沈澱除去液を限外濾過して回収されるか、

③、ナンバンギセルの種子より水飽和フェノールにより抽出され、得られた水層を酢酸カリウム、及びエタノール処理
1 5 し、その沈澱除去液を蒸溜水に対して透析し、その透析内液よりRNAを除去後、得られた水層を更に酢酸カリウム、及びエタノール処理し、沈澱除去液を蒸溜水に対して透析し、その透析内液を濃縮することにより得られるものである。

図面の簡単な説明

2 0 第1図は、腹水型腫瘍に及ぼす本発明の抗癌剤の治療効果を生存率で説明するための図、

第2図は、担癌マウスにおける腹腔内腫瘍細胞の増殖を体重増加で説明するための図、

第3図は、腫瘍を腹腔内に移植後、本発明の抗癌剤の投与
2 5 を受け長期生存したマウスに投薬を中止後、再度腫瘍を移植

- 1 した場合の影響を説明するための図、
- 第4図は、第3図に示す実験群における体重変化を示す図
- 第5図は、本発明の抗癌剤である抽出物2と抽出物3の抗腫瘍効果に関する比較を示す図、
- 5 第6図は、第5図に示す処理マウスにおける体重増加の抑制制度を示す図、
- 第7図は、皮下移植腫瘍への抽出物2の抗腫瘍効果を説明するための図、
- 第8図、第9図、第10図はナンバンギセルの種子からの
- 10 抽出物がIL-2及びIFN誘起能を有することを説明するための図である。

発明を実施するための最良の形態

- まず、ナンバンギセルの種子よりインターロイキン-2、及びインターフェロン- γ 誘起能を有する抽出物の抽出方法
- 15 について具体的に説明する。

〔抽出例 1〕

 ナンバンギセルの種子のリン酸緩衝生理食塩水抽出物（以下、粗抽出物という）の調製

- ナンバンギセルの種子40mgに、カルシウムイオン、マグ
- 20 ネシウムイオンを含有しない0.1モルリン酸緩衝生理食塩水（pH7.2）1mlを加え、乳鉢中において粉碎した。この粉碎物を15000xg、15分間、4℃で遠心処理し、得られた上清を、0.45 μ m径のミリポアフィルターを通して無菌化し、本発明の抽出物を得た。

- 25 〔抽出例 2〕

- 1 上記ナンバンギセルの種子の粉碎物に、等容量の水飽和n-
ブタノールを加え、0℃で15分間攪拌した。この混和物を35
000xgで20分間遠心して、分離した下層の水層を集めた。な
おブタノール層および沈澱物は更に2回ブタノール抽出を行
5 ない、得られる水層分画を更に遠心処理して不溶物を除去し
、蛋白質分解酵素であるプロナーゼを最終濃度20 μ g/mlに
なるように添加し、37℃で一夜処理した。このプロナーゼ処
理によりプロナーゼを含む蛋白質からなる白色沈澱が生じ、
この沈澱を遠心処理により除去した。
- 1 0 次いで、沈澱除去液をカットオフ分子量3500、コアサイド
3000の限外濾過膜(アミコン社、米国)を使用し、圧力1.5
kg/cm²で濃縮し、本発明の抽出物を得た。収量はウロン酸
定量によりナンバンギセルの種子1gにつき45mgであった
。
- 1 5 [抽出例 3]
上記ナンバンギセルの種子の粉碎物に、等容量の水飽和フ
ェノールを加えて0℃で30分間攪拌した後、200xgで10分間
遠心処理し、水層を分離した。水層中に混入しているフェノ
ールをエーテルで抽出除去し、水層に溶解したエーテルは窒
2 0 素ガスを通気することにより除去した。このようにして得ら
れるフェノール抽出物に酢酸カリウムを2%(w/w)の割合で
添加し、10倍容量の95%エタノールを添加し、4℃、一夜静
置した後形成される沈澱物を蒸留水に溶解させた。
この溶液に上記同様2%の割合に酢酸カリウムを添加した
2 5 後等容量のエタノールと混和させ、0℃で30分間静置した。

- 1 その後5000xg、20分間遠心し、主としてRNAを含有する沈
 澱を廃棄した。更に上清に6倍容量のエタノールを添加し、
 1時間静置した後生じた沈澱を5000xg、20分間遠心処理して
 集め、蒸留水に溶解させ、蒸留水に対して透析した。
- 5 この透析内液には多糖類と微量のRNAが混在しているの
 で、RNAを破壊する目的で1 mlあたり30~40 μ gの牛脾
 由来RNA分解酵素(Pancreatic RNase)を添加し、38℃で1
 時間処理した。処理後、酢酸カリウム2%と6倍容量のエタ
10 ノールを添加し、生じた沈澱を遠心処理により集め、蒸留水
 に溶解し、200 xgで遠心処理した。得られた上清を蒸留水に
 対して透析し、透析内液を濃縮し抽出例3による標品とした
 。収量はウロン酸定量によりナンバンギセルの種子1 gあた
 り38 mgであった。

 上述のように、本発明における抽出物質は、ナンバンギセ
15 ルの種子から蒸留水、特にリン酸緩衝生理食塩水により抽出
 されるか、またはモリソン等の方法(Morrison&Leive, Fra
 ctions of Lipopolysaccharide from Escherichia coli 01
 11:B4 Prepared by Two Extraction Procedures, J. Biol. Che
 m. 250 ;2911-2919、1975)、更に同様の方法であるウエス2
0 トフェール等の方法(Westphal, O., and Luderitz, O. Chemisc
 he Erforschung von Lipopolysacchriden gramnegativer B
 akterien, Angew. Chem. 66 ;407-417、1954)により得られる
 高分子多糖体である。

 抽出物質における多糖類の構造、組成は、いまだ充分には
25 判明していないが、ナンバンギセルの種子を抽出する際に、

- 1 ウェストフェール等の方法により水飽和フェノールで抽出すると、蛋白質成分が殆ど結合していない多糖類が得られ、一方、モリソン等の方法を使用し、水飽和n-ブタノールにより抽出すると、脂質であるリピドAが蛋白により結合した多糖類が抽出されるものと思われる。

本発明における抽出物質は、後述するように水可溶性、n-ブタノール不溶性であり、RNA（オルシノール反応を利用したメジャバウム（Mezbaum）法、および紫外外部吸収による）は含有されてなく、分子量は10万～20万の範囲と思われる。

- 1 0 次に、このようにしてナンバンギセルの種子から抽出される物質が、インターロイキン-2、及びインターフェロナー γ の誘起能を有することを説明する。

まず、上記各抽出例により抽出した多糖類分画についての化学分析は、次のように行った。

- 1 5 ウロン酸の定量は、カルバゾール反応を利用したビター等の方法（Bitter, T., and Ewins, R. A modified carbazole reaction for uronic acids. Biochem. J. 81;43, 1961.）により、またRNAはオルシノール反応を利用したメジャバウムの方法（Mezbaum, W. Color reactions of nucleic acid components; In The nucleic acids. (Chargaff, E., and Davidson, J., editors). Academic Press, New York. 1; 283-305, 1939.）、及び紫外外部吸収を指標として定量した。また蛋白質定量はフォリン等の方法（Follin, O., and Clocalteau, V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. J. Biol. Chem. 73 ;627-650, 1927.）、及び紫外外部吸収を指標と
- 2 0
- 2 5

1 して定量した。

(I L - 2 、 及び I F N - γ 活性検索)

検索用標品の調製

ヘパリン添加ヒト末梢血より密度勾配遠心法 (密度、1.07
5 7、Boyum, A. Isolation of mono-nuclear cells and granulocytes from human blood. Scan. J. Clin. Invest. 21 ;77-89, 1967.) を用いて、末梢血単核球 (以下、P B M C という) を分離し、10%胎児牛血清を含有する白血球増殖培養液 (RPM 1-1640) を使用して $10^7 / \text{ml}$ の細胞浮遊液を調製した。

1 0 この P B M C 浮遊液 1 ml に上記各抽出例で抽出した各分面を各々 1 ml 添加し、5%炭酸ガスを含む空气中で37℃で24時間、48時間培養した。この培養上清を 500xg、15分間遠心した後、ミリポアフィルターを通して無菌化した標品を得、以下に記載する I L - 2 、 及び I F N - γ 活性検索に供し
1 5 た。

I L - 2 活性測定法

細胞増殖が I L - 2 依存性である C T L L 細胞を、96穴マイクロプレートに、10%被検標品を含む増殖培養液 500 μ l に 5×10^3 個の C T L L 細胞を浮遊させ各ホールに植え込み、5%炭酸ガス培養器中で37℃で24時間培養した。その後
2 0 各ホールに ^3H -チミジン (アマシャム社、英国) 50 μ Ci を添加して更に16時間培養を継続し、 ^3H -チミジンの取り込み量を液体シンチレーションカウンターで測定した。この場合、I L - 2 力価の算定は、組み換え型 I L - 2 (シオノギ
2 5 社製) を、最終濃度 5.0 、 2.5 、 1.25、0.63、0.31 単位 / ml

- 1 0 になるように調製した標準標品によりCTL細胞を処理
した場合の³H-チミジンの取り込み量より換算した。

IFN- γ 活性測定法

- 5 ヒト羊膜由来FL細胞(10⁶)を60mm径のプラスチックペト
リ皿に植え込み、5%炭酸ガス培養器中で37℃、2日間培養
し、FL単層細胞を調製した。

- 次に被検標品 0.2 ml に最少必須培地 0.8 ml を添加して、
被検標品の5倍希釈したもの0.5mlによりFL単層培養細胞
を12時間、37℃で処理した。その後この処理FL単層培養
1 0 細胞における水疱性口内炎ウィルス(Vesicular Stomatiti
s virus、以下、VSVという)のブラック形成能を、未処
理FL単層培養細胞でのVSVブラック形成能との比較によ
り算定した。IFN力価はVSVブラック形成能を50%減じ
るために必要な被検標品の最高希釈率でもって表現される。

1 5

IFNのタイピング方法

- 被検標品中に含有されるIFNのタイピングは、被検標品
0.2 ml に抗IFN- α/β 抗体(米国国立衛生研究所(NIH)
)INC. 米国)を0.2ml、そして被検標品 0.2 ml に抗IFN
2 0 - γ 抗体(インターフェロンサイエンシーズ INC. 米国)
0.2 ml を添加して、30分間、37℃で培養した後、最少必須
培地 0.6 ml を添加して総容量 1 ml とし、この標品 0.5 ml
によりFL単層培養細胞を37℃、12時間処理し、上記同様
にVSVブラック減少率を測定した。尚、抗IFN- α/β
2 5 抗体或いは抗IFN- γ 抗体は、IFN- α 、またはIFN

- 1 $-\beta$ の100 単位、或いは I F N- γ の100 単位を中和する力価を有するように調製し、試験に供した。

抽出物のクロマトグラフィー

- 抽出例 2 で調製した抽出物を、カラムクロマトグラフィー
5 (Sephadex G-200 フェーマシア、スウェーデン、カラムサイズ; $\phi 0.9\text{cm} \times 30\text{cm}$) を使用し、0.15モル Na Cl-0.02 モル Tris- H Cl 緩衝液 (p H 7.4) により溶出させ、1 分画 2 ml として 2 0 分画採取した。それぞれの分画について、P BMC 1×10^7 個 / ml を 24 穴プレートの各ホールに植え込
1 0 み、更に、各分画 0.1 ml ずつ添加して 24 時間、37℃ で培養した。その後培養上清を採取し、I F N 活性、I L-2 活性を測定した。

次に、抽出例 1 で抽出した粗抽出標品の I L-2 誘導能測定方法を示す。

- 1 5 抽出例 1 で抽出した粗抽出標品と P BMC とを、2 4 時間、4 8 時間培養して調製した培養上清について、上記 I L-2 力価の測定方法により測定した。

- 第 8 図は標準 I L-2 (組み換え I L-2) を用いて作成された定量曲線であり、横軸は標準 I L-2 (単位 / ml)
2 0 、縦軸は ^3H -チミジンの取り込み量を表す。上記 2 4 時間、4 8 時間培養して調製した培養上清についての、それぞれの ^3H -チミジンの取り込みを示すカウント数 (単位は DPM) を計測し、第 8 図によりそのカウント数に相当する I L-2 (単位 / ml) を求めた結果を

- 2 5 第 1 表に示す。

1

第 1 表

標品	^3H -チミジンの取り込み量	IL-2 力価 単位/ ml
24時間	54030	8
48時間	24790	2.2

5

第 1 表により本発明におけるナンバンギセルの種子の粗抽出標品は、IL-2 誘導能を有していることが確認される。

次に、抽出例 1 で調製したナンバンギセルの種子の粗抽出標品の IFN 産生能測定方法を示す。

抽出例 1 で調製したナンバンギセルの種子の粗抽出標品と P BMC とを、24 時間、或いは 48 時間培養した後採取し、得られた上清を 10 倍に希釈したものにより、FL 単層培養細胞を処理して VSV ブラック形成能を測定した。またブラック減少率は下式により算出される。2 回にわたって実験した結果を第 2 表に示す。

$$\left(1 - \frac{\text{標品処理でのブラック数}}{\text{未処理対照でのブラック数}} \right) \times 100$$

2 0

1

第2表

	ブラック数	平均	減少率
未処理	78,87	82.5	—
24時間	43,35	39	52.4
48時間	51,47	49	40.6

未処理	112,106	109	—
24時間	37,41	39	74.2
48時間	67,5	61.5	43.6

第2表により、ナンバンギセルの種子の粗抽出標品は、I
 1 0 F N 産生能を有していることが確認される。特に24時間標品
 は、48時間標品に比較してI F N 活性が高値である。

続いて、ナンバンギセルの種子の粗抽出標品より誘導され
 るI F N のタイピング方法を示す。

ナンバンギセルの種子の粗抽出標品によりP B M C を24時
 1 5 間処理して得た培養上清を5倍に希釈した標品を本実験で使
 用した。2回実験し、その測定結果を第3表に示す。

1

第 3 表

	対 照 (%)	抗 I F N - α / β 処 理	抗 I F N - γ 処 理
未 処 理 対 照	85	—	—
被 検 I F N 標 品	41 (51.8)	37.5 (55.9)	80.5 (5.3)

未 処 理 対 照	112	—	—
被 検 I F N 標 品	42.5 (62.1)	41 (63.4)	107 (4.5)

1 0

尚、表の数値はブラック数を示し、2 プレートの平均値を示す。() 内の数値は、未処理対照 F L 単層培養細胞上での V S V ブラック数に対する抗体処理、或いは未処理被検 I F N 標品で処理した F L 単層培養細胞上での V S V ブラック数の減少率 (%) を示している。

本実験によりナンバンギセルの種子の粗抽出標品は、I F N - γ 誘導能を有していることが確認される。

また、ナンバンギセルの種子の粗抽出標品を上記クロマトグラフィーにかけ、その各分画における I L - 2、及び I F N 誘導能の検索、及びウロン酸 (OD 530 nm、カルバゾール反応)、蛋白質 (ODD 280nm) の定量を行い、その結果を第 9 図に示す。尚この測定において I F N 力価は 5 倍希釈品についての V S V ブラック減少率 (%) を示す。

第 9 図からわかるように、各分画における I L - 2、及び I F N 誘導能、ウロン酸量、及び蛋白質量は同一の傾向を示

2 5

- 1 しており、このことから本発明の粗抽出物は単一物質であることが想定される。

次に、ナンバンギセルの種子から抽出例 2、および抽出例 3 により調製した分画をそれぞれ 500 μ g ウロン酸定量による) ずつ用いて、PBMC を 24 時間刺激して、その培養上清について IL-2 力価を測定した。PBMC は A、B、C、D、E、F の 6 人の人から調製した。IL-2 力価の測定結果について下記第 4 表に示す。

単位は、単位 / ml。

1 0

第 4 表

PBMC 標本	抽出例 2	抽出例 3
A	12.5	3.2
B	11.2	2.5
C	15.3	4.3
D	16.2	5.5
E	18.3	6.6
F	13.6	3.8

- 第 4 表からわかるように、抽出例 2、抽出例 3 により調製した抽出物はいずれも IL-2 誘導能を有するが、抽出例 2 による抽出物はより強い IL-2 誘導能を保有することが明らかである。

- また下記第 5 表に抽出例 2、抽出例 3 により調製した抽出物の IFN- γ 力価の測定結果を示す。測定にあたっては、まず抽出例 2、抽出例 3 により調製した各多糖類分画により

2 5

- 1 24時間、P B M Cを処理して得た培養上清を5倍に希釈し、
この希釈した標品を抗 I F N - γ 処理したもの、または未処
理のものにわけ、次いでこの標品をF L 単層培養細胞を処理
してV S Vブラックを形成させ、抗 I F N - γ 処理、または
5 未処理のF L 単層培養細胞でのV S Vブラック数を比較した
ものである。尚、数値は減少率(%)を示す。

第5表

	抽出例 2		抽出例 3	
PBMC 標本	抗 IFN- γ 未処理	抗 IFN- γ 処理	抗 IFN- γ 未処理	抗 IFN- γ 処理
A	68.8	3.8	52.8	3.2
B	63.5	4.1	48.2	4.8
C	79.3	8.9	68.5	7.8
D	85.2	9.1	71.7	7.9
E	87.4	9.5	78.3	6.5
F	69.5	4.2	55.4	3.7

この第5表から分かるように抽出例2、抽出例3により抽出されたものは、共に強い I F N - γ 誘導能を保有していることがわかる。

- 20 次に、抽出例2で調製した多糖類分画でP B M Cを24時間刺激して得た培養上清について、I L - 2、及び I F N 力価を測定した結果を第10図に示す。I F N 力価はP B M C 上清を5倍希釈した標品についてV S Vのブラック減少率により測定した。尚、黒丸により I L - 2 活性の推移を示し、白
25 三角により I F N 力価の推移を示す。

- 1 第10図からわかるように、多糖類の量に応じてIL-2、IFN力価共に増大することがわかる。

また、バルブシーマウス (Balb-Cマウス) 10匹の腹腔に抽出例2で調製した多糖類を、ウロン酸定量で500 μ gを
5 1mg、3mgを注射したが、28日後においても異常は認められなかった。

本発明は、上記各抽出例により抽出されるIL-2、IFN誘起剤が、抗癌剤として作用することを見出したものである。

- 10 以下、具体例により本発明を説明する。

尚、下記具体例においては、動物としてddYマウスを、腫瘍細胞としてddYマウスに移植可能なSarcoma-180(以下、S-180という)を用いた。また、下記具体例においては、上記抽出例2により得られるものを抽出物2、抽出例3によ
15 り得られるものを抽出物3と称する。

〔具体例1〕

腹水型腫瘍に及ぼす抽出物2の治療効果

ddYマウスに、 2×10^6 個のS-180腫瘍細胞を腹腔内に移植し生存率を見た。

- 20 第1図に示すように、抽出物2の投与を受けないマウス(△印)はS-180の移植を受けた17日目までにすべてのマウス(6匹)が腫瘍死した。

それに対して、腫瘍移植の同日から2日ごとに抽出物2を0.6mg/kg(□印)、1.2mg/kg(+印)、2.5mg/kg(◇
25 印)を腹腔内に投与したマウスはいずれも生存率が上昇した

1 。

即ち、腫瘍移植後29日目までに、抽出物2を0.6 mg/kg
投与したマウスは6匹中3匹が、また1.2 mg/kg投与群では
6匹中5匹が、更に2.5 mg/kg投与群では6匹中4匹が生存
5 した。

尚、データには示さないが、正常マウスに0.6 mg/kg～2.
5 mg/kgを2日おきに投与しても認むべき副作用はなかった
。

次に、担瘤マウスにおける腹腔内腫瘍細胞の増殖を体重増
1 0 加で評価した結果を第2図に示す。

抽出物2の投与を受けなかった担瘤マウス(—印)は、腫
瘍を腹腔内に移植後20g以上の体重増加を示したが、0.6 mg
/kg (——印)、1.2 mg/kg (----印)、2.5 mg/kg (・
・印)の投与を受けて29日目まで生存したマウスの体重
1 5 増加はいずれも5g以内であった。

〔具体例2〕

(S-180 腫瘍を腹腔内に移植後、抽出物2の投与を受け長期
生存したマウスに投薬を中止後、再度S-180 を移植した場合
の影響)

2 0 長期生存(29日以上)したマウスに、投薬を中止し、再
度、S-180 腫瘍細胞を腹腔内に再移植した結果を第3図にお
いて、□印で示す。

また、対照群として無処置のd d YマウスにS-180 を移植
した場合を△印で示す。

2 5 第3図から明らかなように、長期生存マウスにおいては、

- 1 再移植後においても対照群に比して著明に生存率が高かった。
。

また、これらの実験群における体重変化を第4図に示す。

- 第4図からわかるように、長期生存マウスにS-180を再移植
5 した場合（——印）には、対照群（----印）に比して体
重増加の抑制が顕著であった。

〔具体例3〕

（抽出物2と抽出物3の抗腫瘍効果に関する比較）

- d d Yマウスに 2×10^6 個のS-180腫瘍細胞を移植後、
1 0 25mg/kgの抽出物2、或いは同量の抽出物3を2日目ごとに
投与して生存率を見た。その結果を第5図に示す。

第5図からわかるように、生存率は抽出物2投与群（□印）
）が抽出物3投与群（+印）に比してわずかに高かった。

- 次に、これらの処理マウスにおける腫瘍増殖の抑制度を体
1 5 重増加の抑制度で見た結果を第6図に示す。

この場合にも、抽出物2投与群（——印）が抽出物3投
与群に比して僅かに抑制度が強かった。いずれの投与群も無
処理マウスに腫瘍を移植したとき（・・・・印）と比較した
場合には著明な抑制効果が見られた。

- 2 0 〔具体例4〕

（皮下移植腫瘍への抽出物2の抗腫瘍効果）

d d Yマウス背部皮下に、 1×10^6 個のS-180の腫瘍細胞
を移植後5日目より腫瘍内に抽出物2を連日投与した後の
腫瘍の大きさで比較した結果を第7図に示す。

- 2 5 これからわかるように、0.5 mg/kg投与群（・・・・印）

- 1、2.5 mg/kg 投与群（---- 印）とも非投与群（—— 印）に比して著明な腫瘍増殖抑制が見られたが、特に2.5 mg/kg 投与群においてはほぼ完全に腫瘍の増殖は抑制された。

5 産業上の利用可能性

本発明におけるナンバンギセルの種子よりの抽出物は、インターロイキン-2、及びインターフェロン- γ 誘起能を有し、ヒト及び動物における各種ウィルス感染症の予防及び治療に有効であり、また優れた腫瘍増殖抑制作用を有すると共に、認むべき副作用はなく、抗癌材として癌治療に有用である。

1 請求の範囲

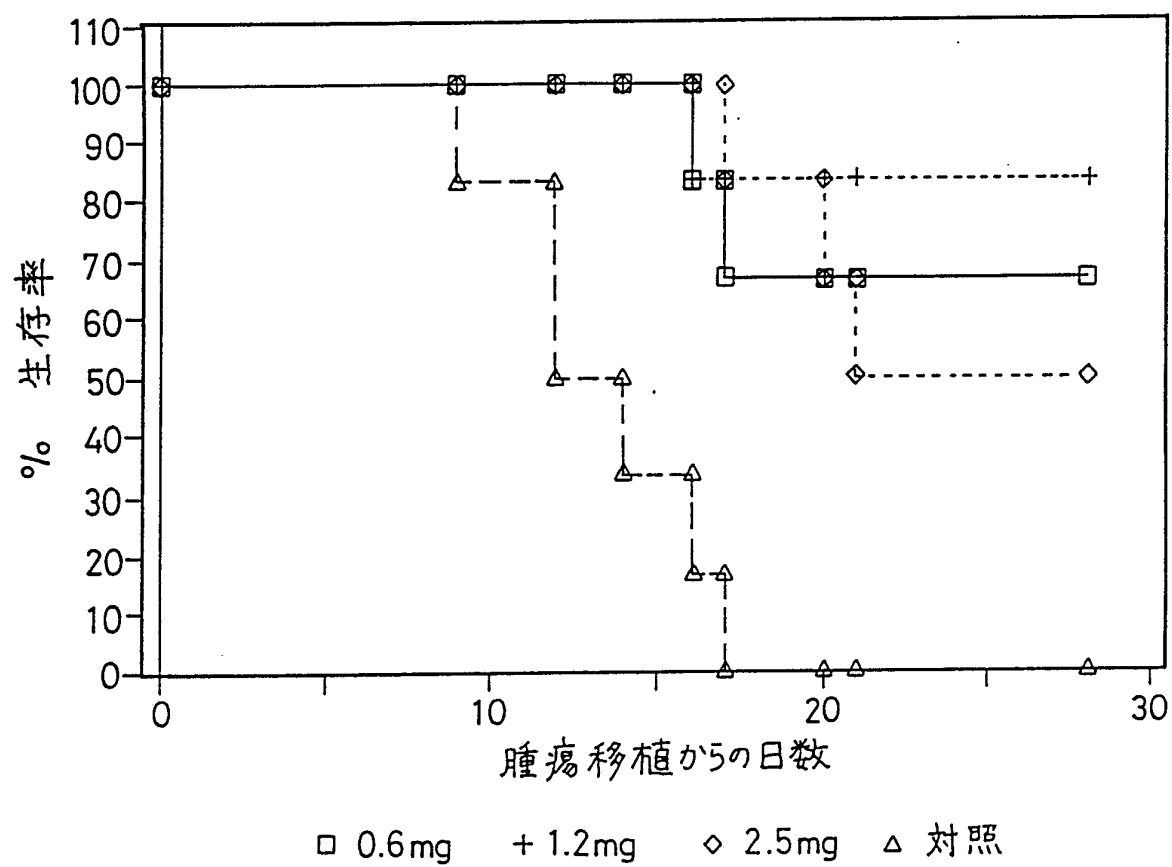
(1) ナンバンギセルの種子から蒸留水により抽出されることを特徴とする、インターロイキン-2 及びインターフェロ
5 ン- γ 誘起能を有する抗癌剤。

(2) ナンバンギセルの種子を水飽和ブタノールを使用して抽出し、次いで得られた水層をプロナーゼ処理し、その沈澱除去液を限外濾過して回収されることを特徴とするインター
10 ロイキン-2 及びインターフェロン- γ 誘起能を有する抗癌剤。

(3) ナンバンギセルの種子を水飽和フェノールを使用して抽出し、次いで得られた水層を酢酸カリウム及びエタノール処理した後、その沈澱除去液を蒸溜水に対して透析して得られる透析内液よりRNAを除去し、その透析内液を濃縮して
15 回収されることを特徴とするインターロイキン-2 及びインターフェロン- γ 誘起能を有する抗癌剤。

第 1 図

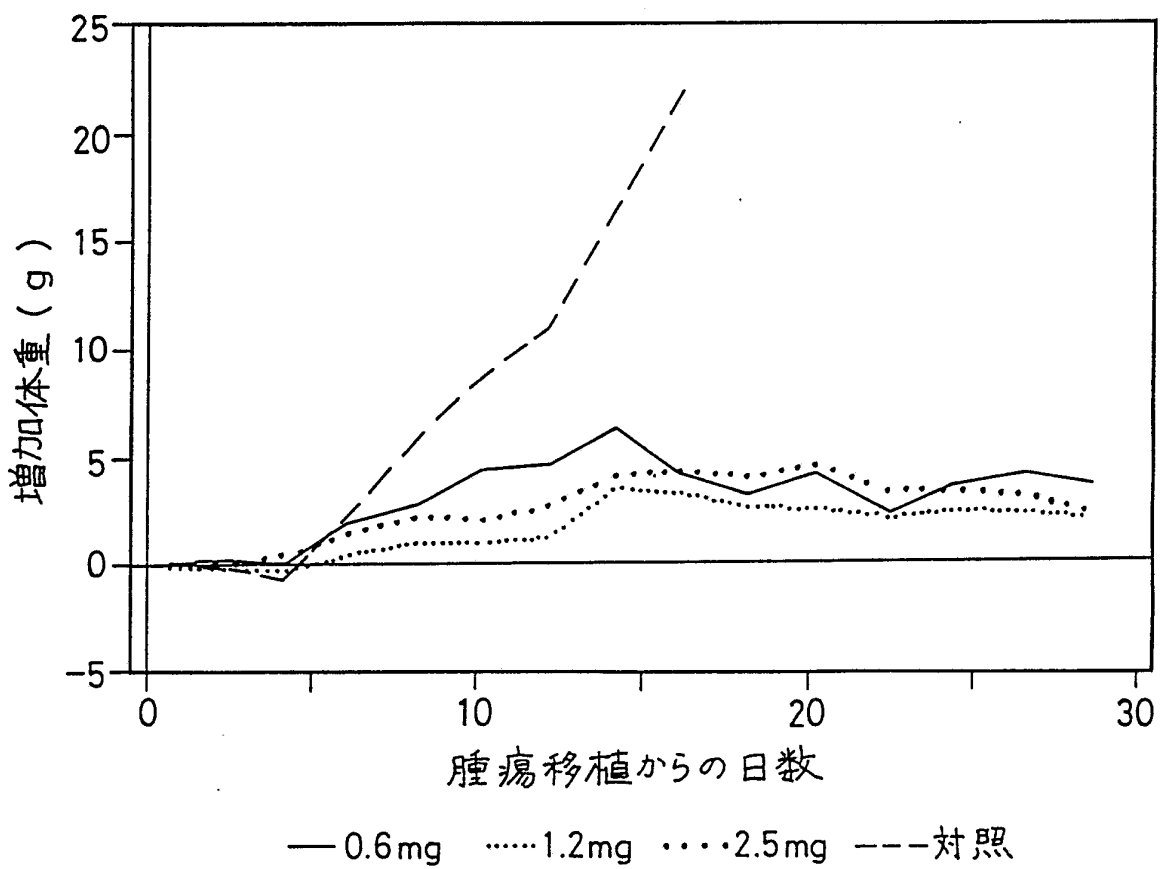
生存率



2 / 10

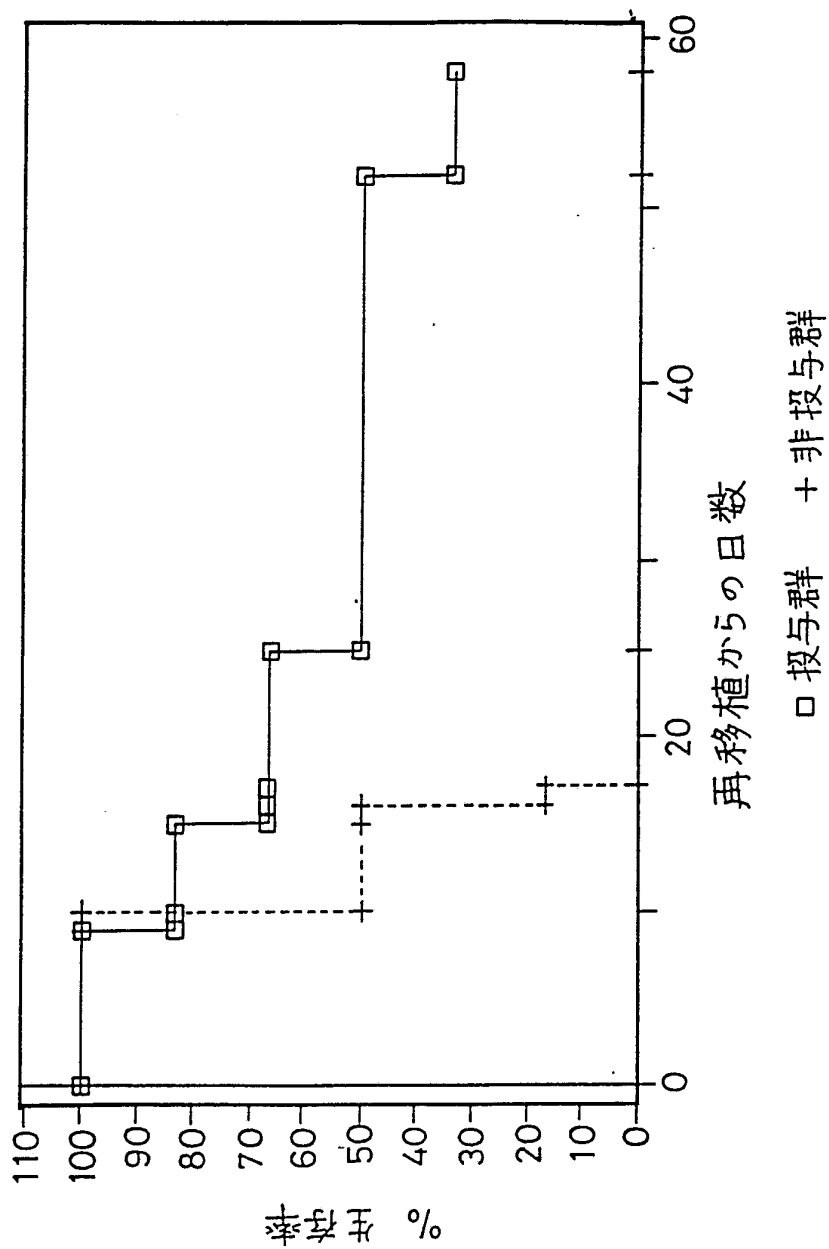
第 2 図

初日からの増加平均



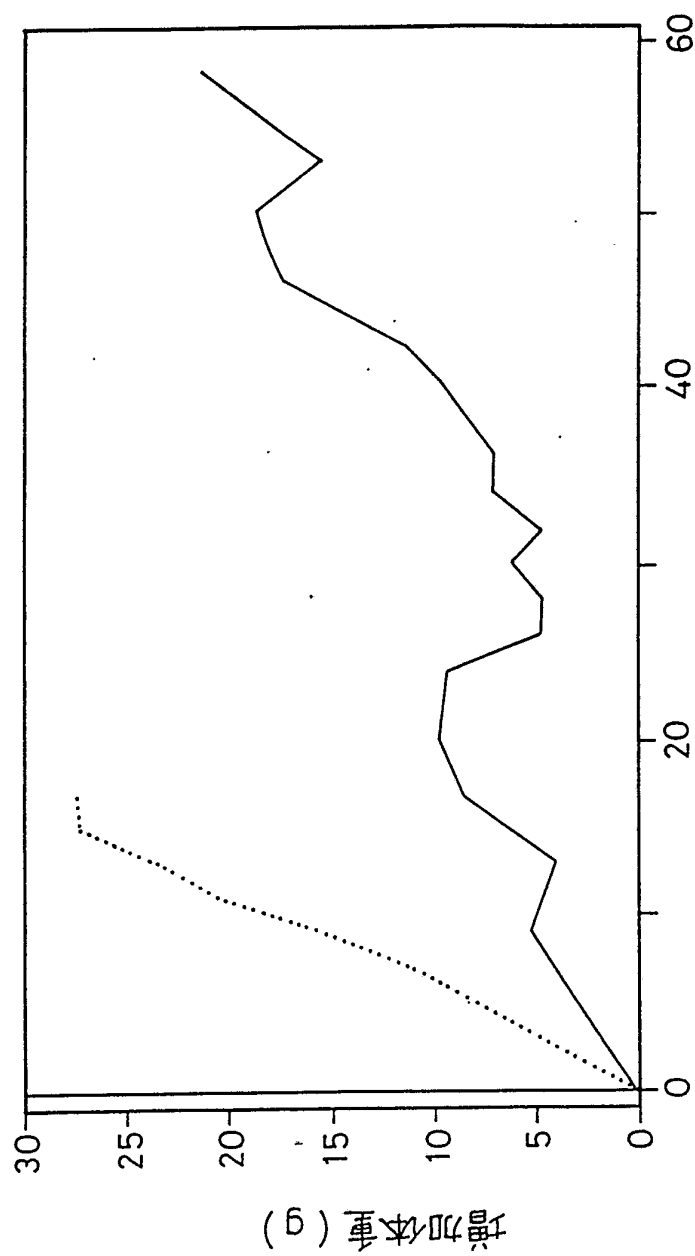
第3図

再移植後の生存率



第4図

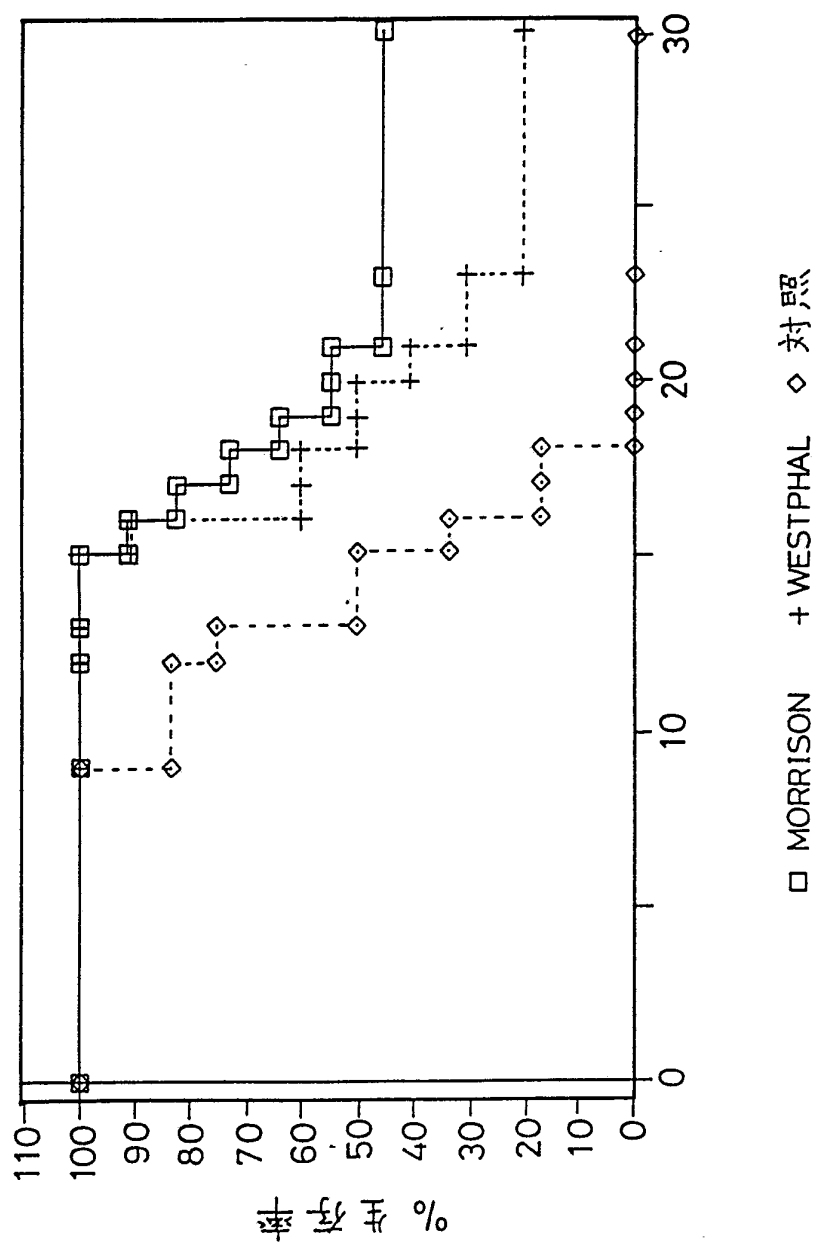
再移植後の体重増加平均



— 再移植群 対照群

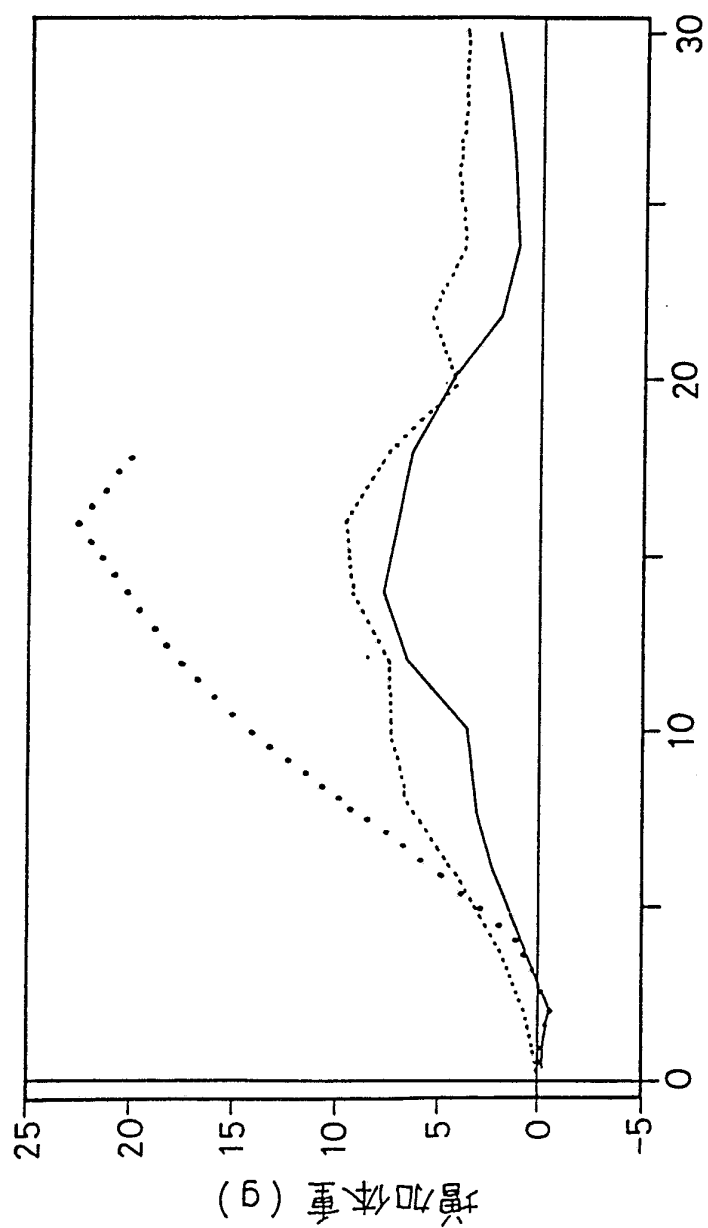
第 5 図

生存率



第 6 図

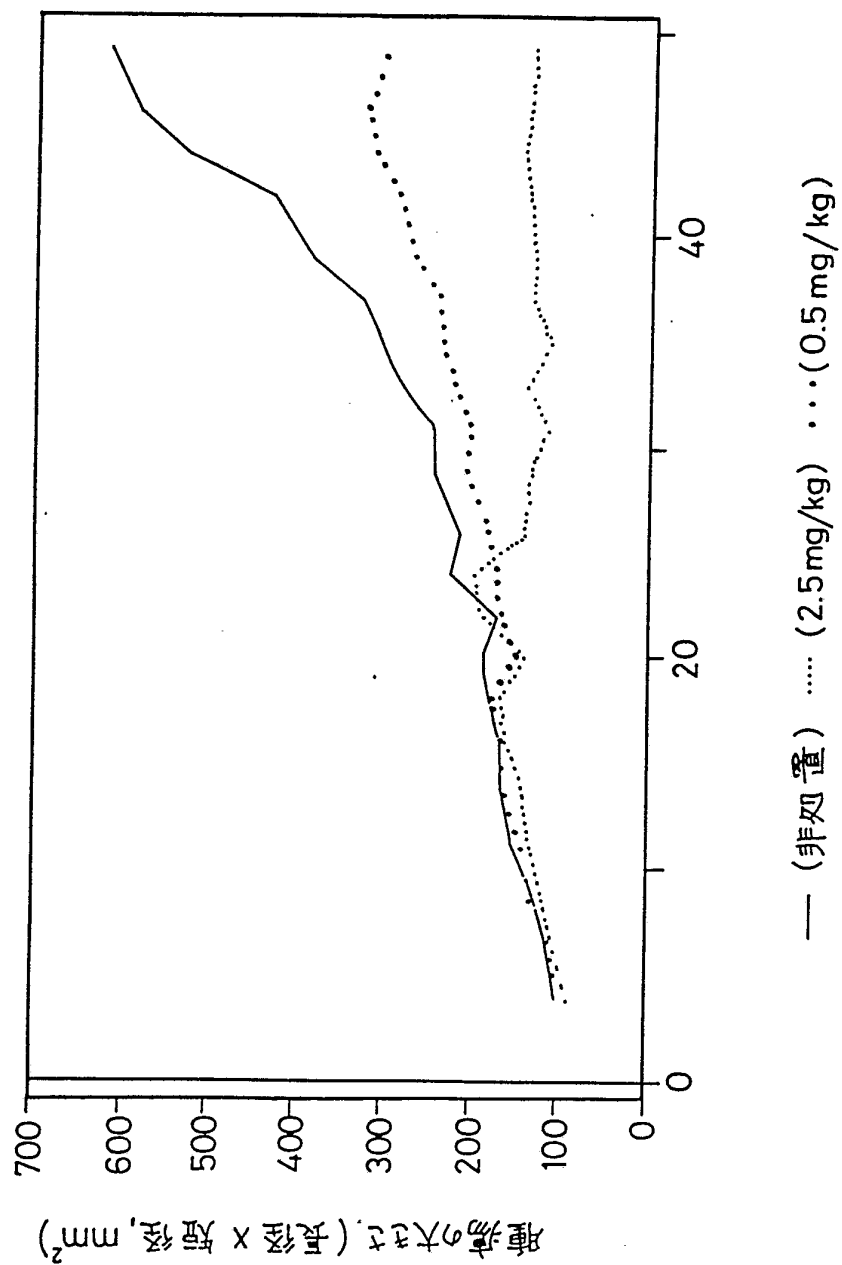
初日からの増加平均



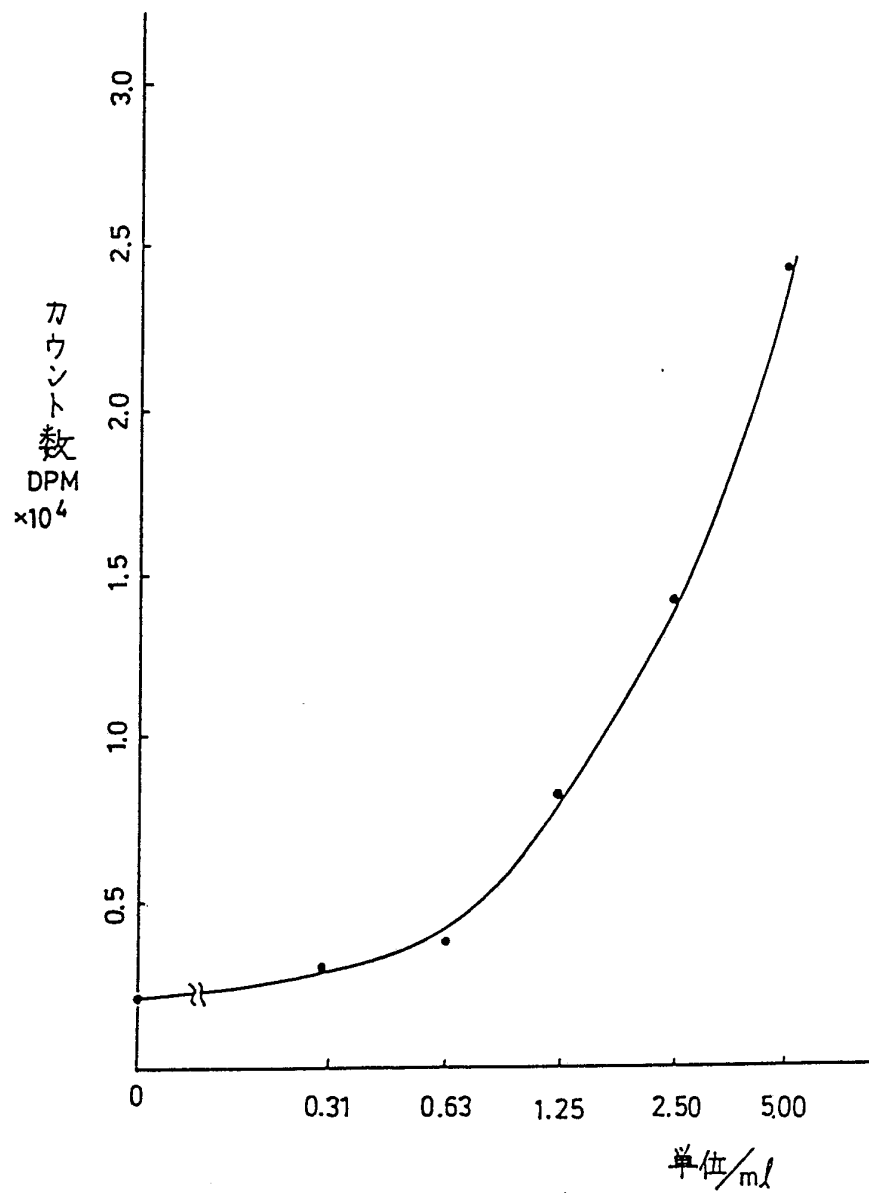
— MORRISON WESTPHAL 対照 (非処置)

第7図

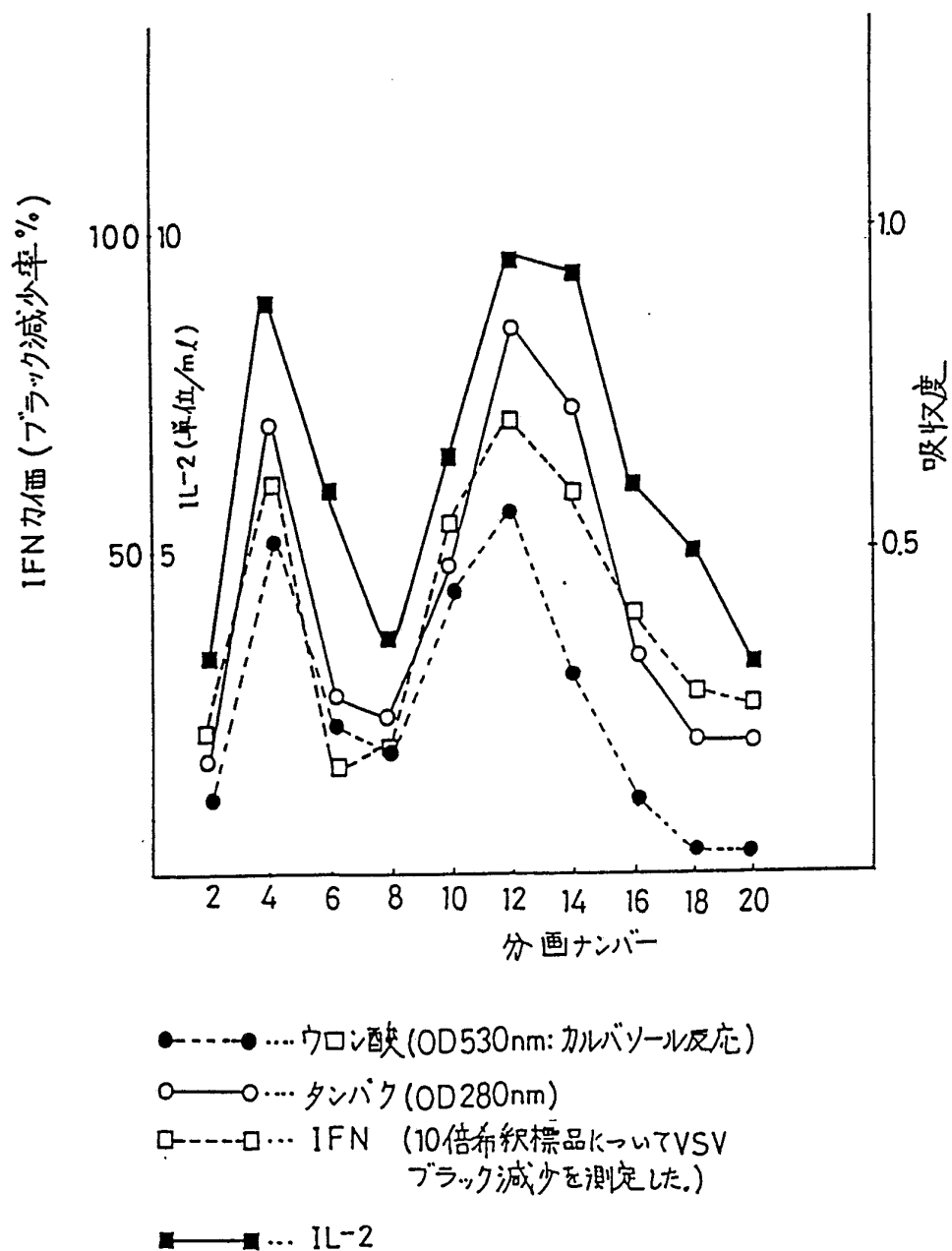
平均



第 8 図

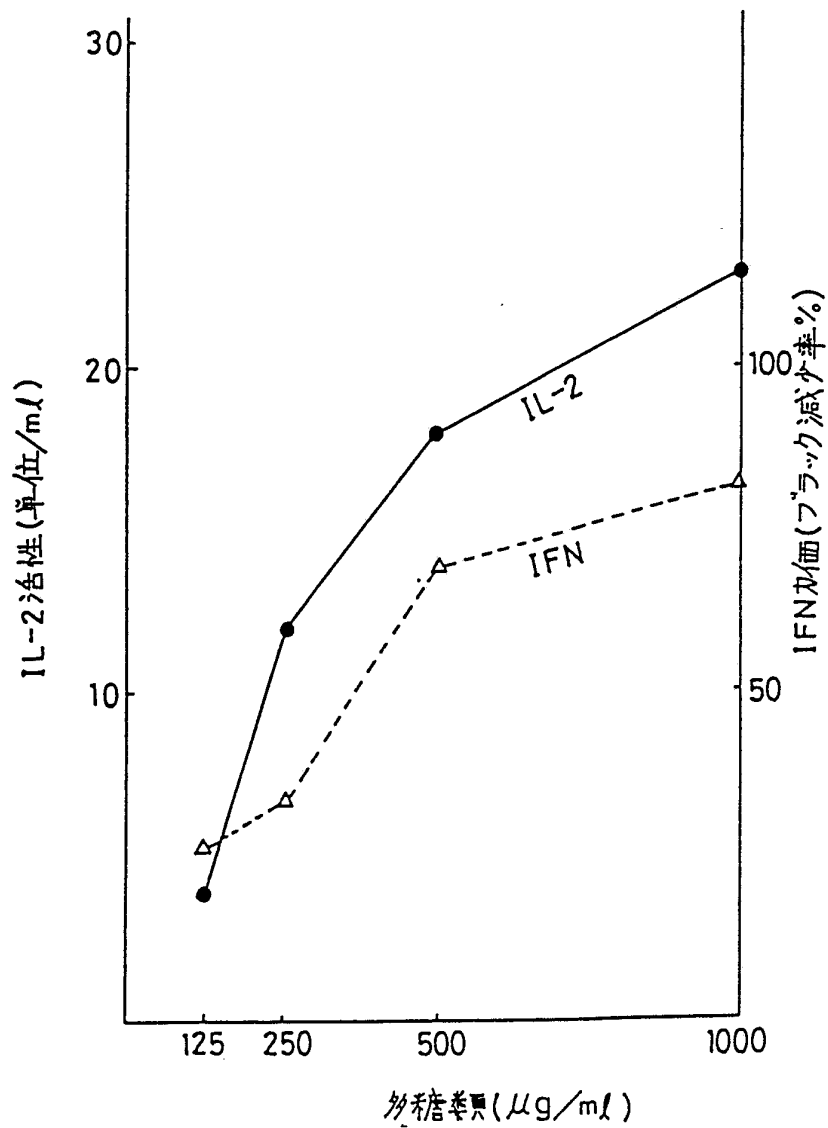


第 9 図



10 / 10

第10図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP91/00864

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int. Cl⁵ A61K35/78ADU, A61K35/78ABH																	
II. FIELDS SEARCHED Minimum Documentation Searched ⁷ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 25%;">Classification System</th> <th style="width: 75%;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 10px;">IPC</td> <td style="text-align: center; padding: 10px;">A61K35/78</td> </tr> </table> Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸			Classification System	Classification Symbols	IPC	A61K35/78											
Classification System	Classification Symbols																
IPC	A61K35/78																
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%;">Category [*]</th> <th style="width: 60%;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 30%;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">JP, A, 2-83331 (Shinya Okubo and another), March 23, 1990 (23. 03. 90), Line 1, left column to line 8, right column, page 1 (Family: none)</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1, 2, 3</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">US, A, 4469685 (The Kitasato Institute), September 4, 1984 (04. 09. 84), Line 53, column 16 to last line, column 18</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1, 2, 3</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">JP, A, 61-263923 (Tsumura Corp.), November 21, 1986 (21. 11. 86), Line 3, right column, page 1 to line 6, upper left column, page 2 (Family: none)</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1, 2, 3</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">JP, A, 57-118519 (Kitazato Kenkyusho), July 23, 1982 (23. 07. 82), Line 1, left column to line 3, right column, page 1 (Family: none)</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1, 2, 3</td> </tr> </table>			Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	X	JP, A, 2-83331 (Shinya Okubo and another), March 23, 1990 (23. 03. 90), Line 1, left column to line 8, right column, page 1 (Family: none)	1, 2, 3	A	US, A, 4469685 (The Kitasato Institute), September 4, 1984 (04. 09. 84), Line 53, column 16 to last line, column 18	1, 2, 3	A	JP, A, 61-263923 (Tsumura Corp.), November 21, 1986 (21. 11. 86), Line 3, right column, page 1 to line 6, upper left column, page 2 (Family: none)	1, 2, 3	A	JP, A, 57-118519 (Kitazato Kenkyusho), July 23, 1982 (23. 07. 82), Line 1, left column to line 3, right column, page 1 (Family: none)	1, 2, 3
Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³															
X	JP, A, 2-83331 (Shinya Okubo and another), March 23, 1990 (23. 03. 90), Line 1, left column to line 8, right column, page 1 (Family: none)	1, 2, 3															
A	US, A, 4469685 (The Kitasato Institute), September 4, 1984 (04. 09. 84), Line 53, column 16 to last line, column 18	1, 2, 3															
A	JP, A, 61-263923 (Tsumura Corp.), November 21, 1986 (21. 11. 86), Line 3, right column, page 1 to line 6, upper left column, page 2 (Family: none)	1, 2, 3															
A	JP, A, 57-118519 (Kitazato Kenkyusho), July 23, 1982 (23. 07. 82), Line 1, left column to line 3, right column, page 1 (Family: none)	1, 2, 3															
[*] Special categories of cited documents: ¹⁰ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"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 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "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 "&" document member of the same patent family															
IV. CERTIFICATION <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search August 21, 1991 (21. 08. 91) </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report September 2, 1991 (02. 09. 91) </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"> International Searching Authority Japanese Patent Office </td> <td style="padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search August 21, 1991 (21. 08. 91)	Date of Mailing of this International Search Report September 2, 1991 (02. 09. 91)	International Searching Authority Japanese Patent Office	Signature of Authorized Officer											
Date of the Actual Completion of the International Search August 21, 1991 (21. 08. 91)	Date of Mailing of this International Search Report September 2, 1991 (02. 09. 91)																
International Searching Authority Japanese Patent Office	Signature of Authorized Officer																

国 際 調 査 報 告

国際出願番号PCT/JP 91/ 00864

I. 発明の属する分野の分類			
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. ⁵ A 61 K 35 / 78 [ADU] A 61 K 35 / 78 [ABH]			
II. 国際調査を行った分野			
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料			
分 類 体 系	分 類 記 号		
IPC	A 61 K 35 / 78		
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの			
III. 関連する技術に関する文献			
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		請求の範囲の番号
X	JP, A, 2-83331 (大久保新也, 外1名), 23. 3月. 1990 (23. 03. 90), 第1頁左欄第1行-同右欄第8行 (ファミリーなし)		1, 2, 3
A	US, A, 4469685 (The Kitasato Institute), 4. 9月. 1984 (04. 09. 84), 第16欄第53行-第18欄末行		1, 2, 3
A	JP, A, 61-263923 (株式会社 津村順天堂), 21. 11月. 1986 (21. 11. 86), 第1頁右欄第3行-第2頁左上欄第6行 (ファミリーなし)		1, 2, 3
A	JP, A, 57-118519 (北里研究所), 23. 7月. 1982 (23. 07. 82),		1, 2, 3
※引用文献のカテゴリー 「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 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「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) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日の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 「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 「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 「&」 同一パテントファミリーの文献			
IV. 認 証			
国際調査を完了した日 21. 08. 91		国際調査報告の発送日 02.09.91	
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)		権限のある職員 特許庁審査官 主 代 静 義 ® 4 C 7 1 8 0	

第2ページから続く情報

(Ⅲ欄の続き)

第1頁左欄第1行ー同右欄第3行(ファミリーなし)

V. ☐ 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1. ☐ 請求の範囲_____は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。
2. ☐ 請求の範囲_____は、有効な国際調査をすることができる程度に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。
3. ☐ 請求の範囲_____は、従属請求の範囲でありかつPCT規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。

VI. ☐ 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

1. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲_____
3. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲_____
4. ☐ 追加して納付すべき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、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。

追加手数料異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。
- ☐ 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。