

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2001-151687
(P2001-151687A)

(43)公開日 平成13年6月5日(2001.6.5)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	データベース(参考)
A 6 1 K 35/78		A 6 1 K 35/78	J 4 C 0 8 8
			Y
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 35/00	
43/00	1 1 1	43/00	1 1 1

審査請求 未請求 請求項の数3 書面 (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平11-375984

(22)出願日 平成11年11月25日(1999. 11. 25)

(71)出願人 390014904
井村屋製菓株式会社
三重県津市高茶屋七丁目1番1号
(71)出願人 398055048
樋▲廻▼ 博重
三重県安芸郡河芸町南黒田554
(72)発明者 樋廻 博重
三重県安芸郡河芸町大字南黒田554番地
(72)発明者 澤野 裕子
三重県津市高野尾町2996番地の222
(74)代理人 100074206
弁理士 鎌田 文二 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アポトーシス誘導性癌細胞増殖抑制剤

(57)【要約】

【課題】 アポトーシス誘導性の細胞増殖阻害物質を含有する植物を発見し、このものから得られる細胞増殖阻害物質を有効成分とするアポトーシス誘導性細胞増殖阻害剤を提供する。

【解決手段】 マメ科アズキの種子を熱水に浸漬し、この熱水をポリスチレンゲルと混合した後、このポリスチレンゲルに吸着した成分をエタノールで溶出させる。その際、エタノールの溶出工程は、35～45重量%濃度のエタノール水溶液でポリスチレンゲルを洗浄する工程と、その後で55～80重量%濃度のエタノール水溶液で溶出した成分を抽出する工程から構成する。抽出された成分を有効成分として含有するアポトーシス誘導性細胞増殖抑制剤とする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 マメ科アズキの種子から水およびエタノールを溶媒として抽出された成分を有効成分として含有するアポトーシス誘導性癌細胞増殖抑制剤。

【請求項 2】 マメ科アズキの種子を熱水に浸漬し、この熱水をポリスチレンゲルと混合した後、このポリスチレンゲルに吸着した成分をエタノールで溶出させることにより、液状成分を抽出することからなるアポトーシス誘導性癌細胞増殖抑制物質の抽出方法。

【請求項 3】 エタノールの溶出工程が、35～45重量%濃度のエタノール水溶液でポリスチレンゲルを洗浄する工程と、その後55～80重量%濃度のエタノール水溶液で溶出した成分を抽出する工程からなる請求項2に記載のアポトーシス誘導性癌細胞増殖抑制物質の抽出方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】この発明は、アポトーシス誘導に基づいて細胞の増殖を抑制する作用のあるアポトーシス誘導性癌細胞増殖抑制剤およびアポトーシス誘導性癌細胞増殖抑制物質の抽出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】アポトーシスは、生物個体発生における組織や臓器の形成、生体の恒常性の維持と防御に重要な働きをしているだけでなく、多くの病気の発生に深い関係があることが解明されつつある。

【0003】また、アポトーシスは、プログラム細胞死とも呼ばれるように、これを細胞形態学的に見ると、先ず核の凝縮が起こり、次いで細胞縮小、空洞化と細胞表面の平滑化、細胞間隙の拡大、周囲からの細胞の遊離、細胞の断片化（アポトーシス小体）、マクロファージなどによる貪食が起こる。なお、生化学的には、アポトーシス誘導が起こると、先ずDNA分解酵素が活性化されて、ヌクレオソームごとにDNAが断片化される。

【0004】そのため、アポトーシスによって細胞死が起こった事実、断片化されたDNAが電気泳動によってDNAラダー（はしご状態）として観察できるようになることで確認できる。

【0005】なお、アポトーシスによる細胞の制御作用の異常は、癌形成のひとつの原因であると考えられており、本来は死滅すべき細胞が、アポトーシスを起こすことなく生き残ることにより、その細胞が様々な刺激を受けて染色体上に変異を重ね、最終的には癌細胞になるといわれている。

【0006】このように癌細胞は、アポトーシスの耐性機構を獲得して初めて増殖を可能としている。このことから、種々の遺伝子変異を伴う細胞の癌化の過程は、アポトーシスに対する耐性獲得の過程とも関係しており、逆にいえば、特定の細胞に対して積極的にアポトーシスを誘導することができれば、その細胞の癌化を防止でき

る。

【0007】また、アポトーシス誘導性の癌細胞増殖抑制の効果は、細胞を既存の制癌剤や放射線などで壊死させる場合とは異なり、患部周囲の正常細胞にダメージを与えることなく、細胞の制御作用の異常を抑制できるので、副作用を防止できる効果がある。

【0008】アポトーシス誘導性の癌細胞増殖阻害の開示に関する刊行物としては、平成11年特許第2967190号公報に、ソバ種子由来の蛋白質分解酵素阻害剤であるBWI-3が、白血病に代表される血液癌由来の株化細胞に対してアポトーシスを誘導することが記載されている。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】しかし、これまでに発見された植物由来のアポトーシス誘導性の癌細胞増殖阻害物質は、上記したソバ種子由来のBWI-3のように極めて限られた植物種から得られるものであり、確実に作用するアポトーシス誘導性物質をより多くの生物から発見し、これを癌細胞増殖阻害剤として適用することが課題であった。

【0010】また、ヒトなどに対して処方される植物由来のアポトーシス誘導性癌細胞増殖阻害物質を含む薬剤は、その効能が処方部位や個人差によって変わる可能性があるため、より多くの植物種等から抽出された多種類の有効成分を開発するべきものである。

【0011】そこで、この発明の課題は、上記した問題点を解決して、新たにアポトーシス誘導性の癌細胞増殖阻害物質を含有する植物を発見し、このものから得られる癌細胞増殖阻害物質を有効成分とするアポトーシス誘導性癌細胞増殖阻害剤を提供することである。

【0012】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するため、この発明においては、マメ科アズキの種子から水およびエタノールを溶媒として抽出された成分を有効成分として含有するアポトーシス誘導性癌細胞増殖抑制剤としたのである。

【0013】上記した抽出成分を有効成分とするアポトーシス誘導性癌細胞増殖抑制剤は、後述の実験結果からも明らかなように、これを癌細胞や悪性腫瘍細胞のような異常に活発に増殖する病態細胞に接触させることによってDNAの断片化を起こし、癌細胞の増殖を阻害して細胞核の凝縮および細胞の縮小を起こし、すなわちアポトーシス誘導性の癌細胞増殖抑制作用がある。

【0014】なお、アポトーシス誘導性は、細胞分裂の速度が異常に速い特異的な病変細胞に対して顕著な細胞増殖抑制を示す性質であるが、正常細胞においては、細胞分裂の速度が病変細胞に比べて著しく遅いので、アポトーシス誘導性癌細胞増殖抑制剤の影響による弊害は殆どないと考えられる。

【0015】また、前記した課題を解決するためのアポ

トースス誘導性癌細胞増殖抑制剤の有効成分を確実に製造するために、マメ科アズキの種子を熱水に浸漬し、この熱水を冷却後、ポリスチレンゲルと混合した後、このポリスチレンゲルに吸着した成分をエタノールで溶出させることにより、液状成分を抽出することからなるアポトースス誘導性癌細胞増殖抑制物質の抽出方法を採用したのである。

【0016】この抽出方法では、マメ科アズキの種子の熱水抽出物がポリスチレンゲルに効率よく吸着され、これをエタノール水溶液で溶出した成分として回収することにより、アポトースス誘導性のある癌細胞増殖抑制物質を効率よく採取することができる。

【0017】また、上記の抽出方法において、エタノールの溶出工程が、35～45重量%濃度（好ましくは40重量%濃度）のエタノール水溶液でポリスチレンゲルを洗浄する工程と、その後55～80重量%濃度（好ましくは60重量%濃度）のエタノール水溶液で溶出した成分を抽出する工程からなるようにすれば、アポトースス誘導性癌細胞増殖抑制剤の有効成分をより確実に製造できる。

【0018】そして、約40重量%濃度のエタノール水溶液でポリスチレンゲルを洗浄する工程において、ポリスチレン吸着成分のうち、アポトースス誘導性癌細胞増殖抑制物質が含まれている確率が低い濃度のエタノール水溶液を除去し、その後、多くのアポトースス誘導性癌細胞増殖抑制物質が含まれていると考えられる成分を約60重量%濃度のエタノール水溶液で溶出させることにより可及的に高濃度のものを効率よく回収できる。

【0019】

【発明の実施の形態】この発明に用いるアズキ（小豆）の種子は、マメ科のアズキ（*Phaseolus angularis*）の子実であって、通常、食品として入手できる生または乾燥して保存性を高めたものである。因みに、アズキの種子は、ダイズに比べてタンパク質および脂肪が少なく、可溶無窒素物に富んでいる。その組成（重量%）は、水分12.7、粗タンパク質22.01、粗脂肪0.40、無窒素物55.39、粗繊維6.44、灰分3.06というのが平均的なものである。

【0020】このようなアズキの種子から所期した成分を抽出するには、水およびエタノールを溶媒として抽出する。すなわち、水およびエタノールを溶媒として抽出する際には、好ましくは熱水抽出物をポリスチレンゲルに接触させ、ポリスチレンゲルに吸着した成分をエチルアルコールで溶出させる。

【0021】好ましい抽出工程としては、まず、マメ科アズキの種子を例えば80～100程度の熱水（加熱された水蒸気であってもよい。）に浸漬し、この熱水を三次元架橋構造の多孔質ポリマーからなる合成吸着剤と混合し、抽出対象物を含む有機物を合成吸着剤に吸着させる。

【0022】合成吸着剤の具体例としては、ポリスチレンゲルからなる三菱化学社製のDAIAION HPシリーズ、特にHP-20などが適当である。この合成吸着剤は、マクロポアーを有する不溶性の三次元架橋構造ポリマーからなるものであって、イオン交換基のような官能基は有していないが、ファンデルワールス力により、種々の有機物を吸着する。そして、吸着した有機物は、種々の有機溶媒または酸、アルカリによって溶離することができる。

【0023】因みに、三菱化学社製の合成吸着剤であるDAIAION HP-20は、水分56.5%、比表面積511（ m^2/g ）、水銀圧入法による細孔容積1.18（ ml/g ）、窒素吸着法による細孔容積1.30（ ml/g ）、溶媒膨潤比は、メタノールで1.31、水で1.00、セファロスポリン-C吸着量は、38g/lという物性のものである。

【0024】そして、この発明では、ポリスチレンゲルに吸着した成分をエタノールで溶出させるが、その際、約40重量%濃度のエタノール水溶液でポリスチレンゲルを洗浄する工程と、その後で約60重量%濃度のエタノール水溶液で溶出した成分を抽出する工程からなる工程を採用することが好ましい。

【0025】このようにアポトースス誘導性癌細胞増殖抑制物質は、マメ科アズキの種子を熱水に浸漬し、この熱水（いわゆる煮汁）を遠心分離して上清を得て、この上清に含有されている機質成分をポリスチレンゲルに吸着させ、これを充填したカラムに所定濃度のエタノールを導入して溶出した成分（フラクション）を濃縮して得られる。なお、このような基本的な製造工程には、適宜に溶媒を加える希釈や濾過、または滅菌処理を加えることができる。

【0026】このようにして得られたアズキの煮汁中の所定成分を有効成分として含有するアポトースス誘導性癌細胞増殖抑制剤は、必要に応じて賦形剤、甘味料やビタミン類その他の副次的材料を添加し、例えば、カプセルや錠剤、シロップ状に調製し、主として経口的に摂取される形態が好ましい。

【0027】特に、この発明のアポトースス誘導性癌細胞増殖抑制剤は、飲料に添加してもよく、例えばスポーツドリンクやお茶のように日常的に摂取したり、その他の多くの食品に添加し、健康食品または特定保健用食品として提供することもできる。また、この発明では、食品製造工程で副生する小豆煮汁を無駄にすることなく、有効利用を計ることができる。

【0028】

【実施例および比較例】〔実施例1〕アズキ（種子）の煮汁（100の熱水中で2時間加熱したアズキ）1kg（約1リットル）を遠心分離機で9000回転、10分、4の条件で遠心分離し、上澄みの液体を分取した。

【0029】この液体をポリスチレンゲルからなる合成吸着剤（三菱化学社製：DAIAION HP-20）300mlと混合し、12時間、4で攪拌混合した後、傾斜法によって上澄みを廃棄した。有機物が付着した合成吸着剤は、水500mlで3回洗浄し、これをカラムに充填し、先ず40%濃度のエタノールを1.5リットル通過させ、このエタノールを廃棄した後、次に60%濃度のエタノールを1.0リットル導入し、カラムを通過した液を小豆煮汁エタノール抽出物（実施例）として採取した。なお、その後のカラムは85%濃度エタノール0.5リットルで洗浄した。

【0030】得られた小豆煮汁エタノール抽出物の実施例のアポトーシス誘導性および癌細胞の増殖抑制性を調べるために以下の実験を行なった。

【0031】＜実験1＞ヒト胃癌細胞を10容量%牛胎児血清含有RPMI培地で培養した。5×10⁵個/mlの密度になるようにヒト胃癌細胞を調整した6つの培養液のうち、3つに対して、実施例の小豆煮汁エタノール抽出物の50%エタノール溶液を最終濃度が1mg/ml、2mg/mlまたは3mg/mlとなるように添加し、37、95～5%CO₂の条件下で3日間培養した。また、対照群として他の3つの試料液に対し、50%エタノール溶液を20μl、40μlまたは60μl添加し、同培養液を前記と同じ条件で培養した。

【0032】そして、各培養液を遠心分離し、上澄みを除去した後に残った細胞を1回PBS（-）で洗浄し、その細胞ペレットに細胞融解用バッファーを加えて細胞を融解し、RNase溶液を加え、50で2.5時間反応させた後、DNA断片を抽出した。

【0033】そして、DNA抽出液とゲルローディング液を混合して2%アガロースゲル板のウェルに添加し、100Vで電気泳動を行なった。ゲルを水に浸してUVトランスイルミネーターでエチジウムブロマイド蛍光を発するDNAを検出した写真を図1に示した。

【0034】図中、番号（1）～（6）の試験に用いた培養液抽出物と各培地に対する添加物を一括して示すと、以下の通りである。

【0035】

（1） 50%エタノール 20μl

（2） 50%エタノール 40μl

（3） 50%エタノール 60μl

（1） 50%エタノール 20μl <2日培養>

（2） 50%エタノール 20μl <3日培養>

（3） 実施例の50%エタノール溶液 2mg/ml <1日培養>

（4） 実施例の50%エタノール溶液 2mg/ml <2日培養>

（5） 実施例の50%エタノール溶液 2mg/ml <3日培養>

（6） 大豆サポニンの50%エタノール溶液 2mg/ml <1日培養>

（7） 大豆サポニンの50%エタノール溶液 2mg/ml <2日培養>

（8） 大豆サポニンの50%エタノール溶液 2mg/ml <3日培養>

図2の結果からも明らかなように、エタノールを添加し

（4） 実施例の50%エタノール溶液 1mg/ml

（5） 実施例の50%エタノール溶液 2mg/ml

（6） 実施例の50%エタノール溶液 3mg/ml

図1の結果からも明らかなように、エタノールを添加してヒト胃癌細胞を培養したもの（1）～（3）では、電気泳動によってDNAバンドが分散せず、DNAが断片化されておらず、すなわち、アポトーシス誘導による癌細胞の増殖抑制が起こっていないことがわかる。

【0036】これに対して、実施例の小豆煮汁エタノール抽出物を添加してヒト胃癌細胞を培養したもの（4）～（6）では、電気泳動によってDNAバンドが分散し、DNAが断片化され、アポトーシス誘導による癌細胞の増殖抑制が起こっていることがわかる。

【0037】＜実験2＞ヒト胃癌細胞を10容量%牛胎児血清含有RPMI培地で培養した。5×10⁵個/mlの密度になるようにヒト胃癌細胞を調整した8つの培養液のうち、3つの培養液に対して実施例の小豆煮汁エタノール抽出物の50%エタノール溶液を最終濃度が2mg/mlとなるように添加し、また他の3つの培養液に対しても大豆サポニン（和光純薬社製）の50%エタノール溶液を最終濃度が2mg/mlとなるように添加して、37、95～5%CO₂の条件下で1～3日間培養した。また、対照群として前記培養液のうち、残りの2つに対して50%エタノール溶液を20μl添加した同培地を前記と同じ条件で2～3日培養した。

【0038】その後、各培養液を遠心分離し、上澄みを除去した後に残った細胞を1回PBS（-）で洗浄し、その細胞ペレットに細胞融解用バッファーを加えて細胞を融解し、RNase溶液を加え、50で2.5時間反応させた後、DNA断片を抽出した。

【0039】そして、DNA抽出液とゲルローディング液を混合して2%アガロースゲル板のウェルに添加し、100Vで電気泳動を行なった。ゲルを水に浸してUVトランスイルミネーターでエチジウムブロマイド蛍光を発するDNAを検出した写真を図2に示した。

【0040】図中、番号（1）～（8）の試験に用いた培養液に対する添加物と培養期間を一括して示すと、以下の通りである。なお、図中、Mは、DNA分子量マーカーを示している。

【0041】

電気泳動によってDNAバンドが分散せず、すなわち、DNAが断片化されておらず、アポトーシス誘導による癌細胞の増殖抑制が全く起こっていないことがわかる。また、大豆サポニンを添加してヒト胃癌細胞を培養したものの(6)～(8)では、培養期間が長いほどわずかに電気泳動によってDNAバンドは分散したが、DNAの断片化は不十分であり、アポトーシス誘導による癌細胞の増殖抑制がほとんど起こっていない。

【0042】これに対して、実施例の小豆煮汁エタノール抽出物を添加してヒト胃癌細胞を培養したものの(3)～(5)では、電気泳動によってDNAバンドが分散し、DNAの断片化は培養期間が長いほど進行しており、アポトーシス誘導による癌細胞の増殖抑制が起こっていることがわかる。

【0043】<実験3>ヒト胃癌細胞を10容量%牛胎児血清含有RPMI培地で培養した。 5×10^5 個/mlの密度になるようにヒト胃癌細胞を調整した4つの培養液のうち、3つに対して、実施例の小豆煮汁エタノール抽出物の50%エタノール溶液を最終濃度が1mg/ml、2mg/mlまたは3mg/mlとなるように添加し、他の1つの培養液(ブランク)に対しては50%エタノール溶液を20 μ l添加し、全ての培養液を37、95～5%CO₂の条件下で3日間培養した。

【0044】そして、ブランクのヒト胃癌細胞の増殖量を100%として、各培養液の最終濃度(培養3日後)での胃癌細胞数を計測して増殖率を求め、得られた増殖曲線を図3に示した。

【0045】図3の結果からも明らかなように、培養液に対して実施例の小豆煮汁エタノール抽出物の添加量が多いほどヒト胃癌細胞の増殖率は低くなっており、この発明のアズキ抽出成分に胃癌細胞増殖抑制効果のあることがわかる。

【0046】また、上記実験中に顕微鏡で観察したブランクの培養液中のヒト胃癌細胞を図Aに示し、小豆煮汁エタノール抽出物の50%エタノール溶液2mg/ml(最終濃度)の培養液中のヒト胃癌細胞を図Bに示し

た。

【0047】この結果、図Bの胃癌細胞は、明らかに縮小し、空洞化しており、細胞形態的にもアポトーシスが誘導されていることが観察された。

【0048】

【発明の効果】この発明は、以上説明したように、マメ科アズキの種子から所定溶媒で抽出された成分を有効成分とするアポトーシス誘導性癌細胞増殖抑制剤としたので、アポトーシス誘導性のある新規な癌細胞増殖阻害物質を抽出し、新規なアポトーシス誘導性癌細胞増殖阻害剤を提供できるという利点がある。

【0049】また、この発明は、所定の工程を必須工程とするアポトーシス誘導性癌細胞増殖抑制物質の抽出方法としたので、熱水抽出物がポリスチレンゲルに効率よく吸着され、吸着された物質のみをエタノール水溶液で溶出させて、アポトーシス誘導性癌細胞増殖抑制物質を効率よく採集することができる。

【0050】また、上記の抽出方法において、エタノールの溶出が、所定濃度のエタノール水溶液で洗浄し、さらに所定濃度のエタノール水溶液で抽出する工程からなるようにすれば、より確実にかつ効率よくアポトーシス誘導性癌細胞増殖抑制物質を抽出することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例または比較例を作用させたヒト胃癌細胞培養液から得られたDNA抽出液のアガロースゲル電気泳動図

【図2】実施例または比較例を作用させたヒト胃癌細胞培養液から得られたDNA抽出液のアガロースゲル電気泳動図

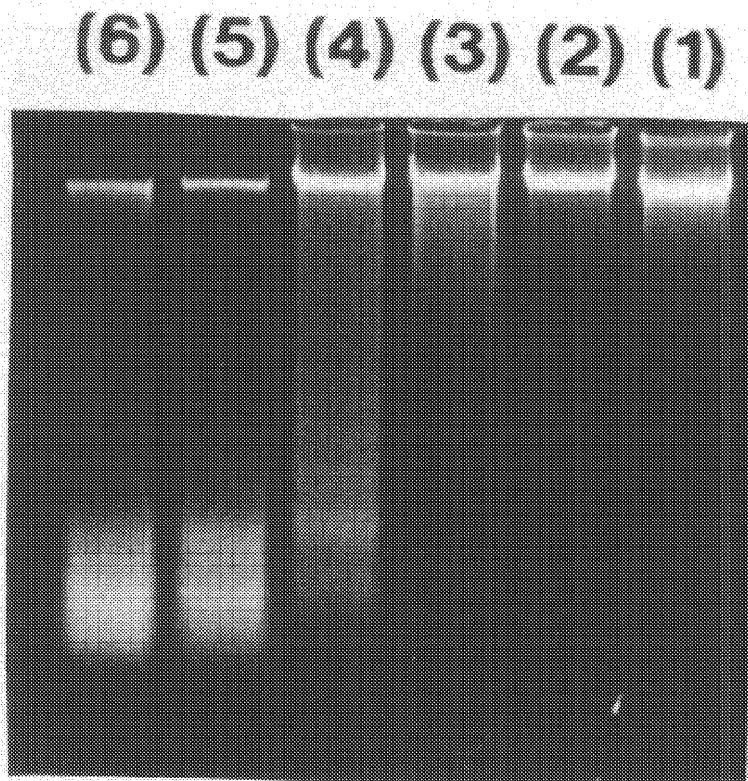
【図3】実施例の小豆煮汁エタノール抽出物量とヒト胃癌細胞増殖率との関係を示す図表

【図4】(A)50%エタノールを作用させたヒト胃癌細胞の形態を示す顕微鏡写真

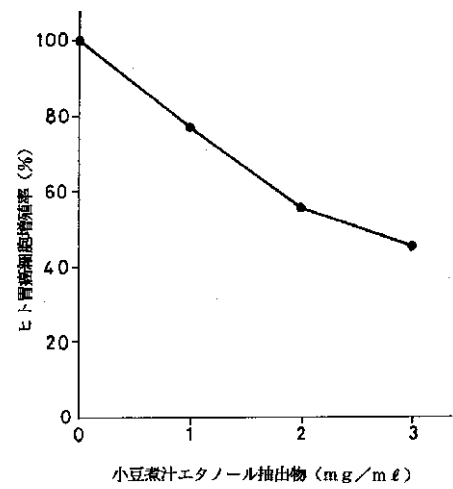
(B)実施例の小豆煮汁エタノール抽出物を作用させたヒト胃癌細胞の形態を示す顕微鏡写真

【図 1】

図面代用写真

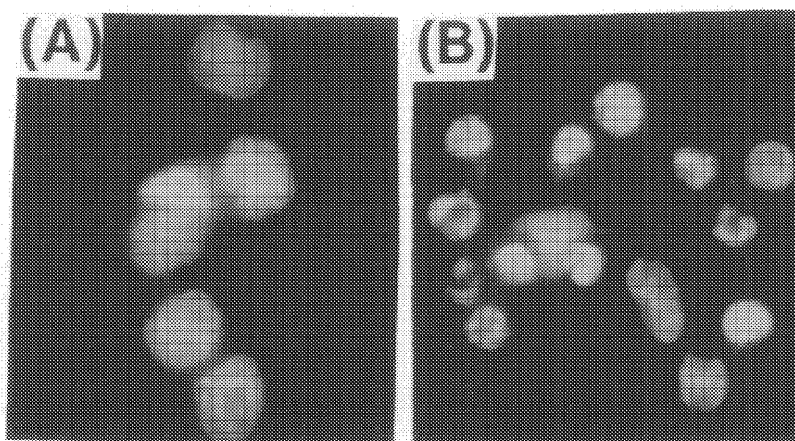


【図 3】



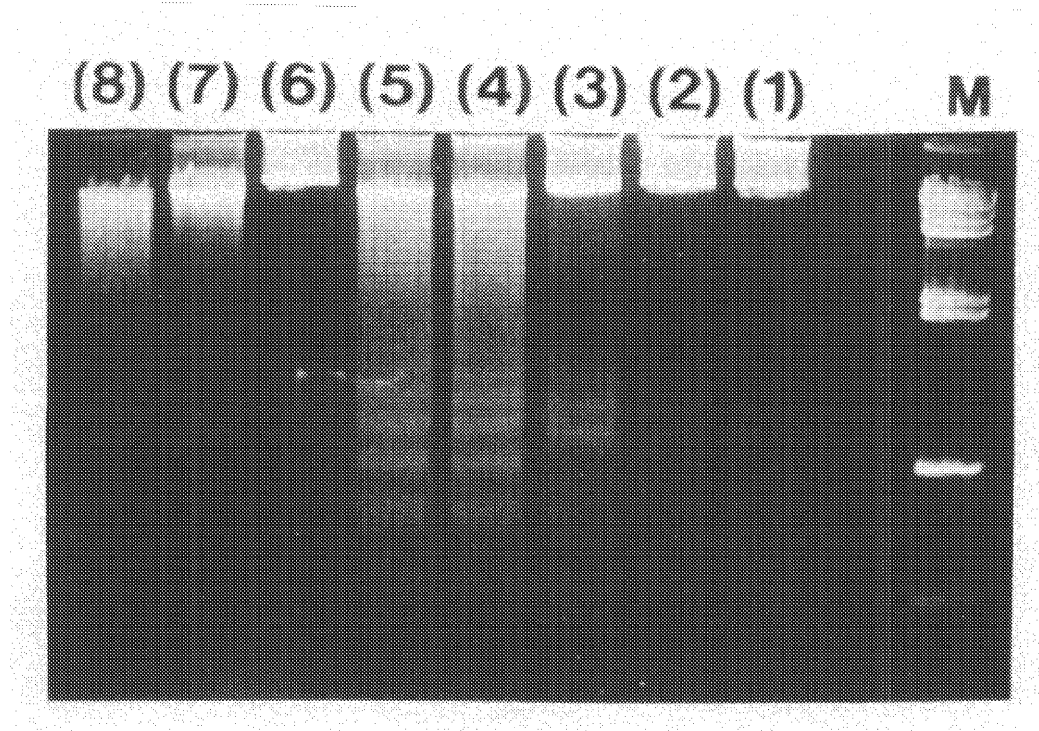
【図 4】

図面代用写真 (カラー)



【図 2】

図面代用写真



フロントページの続き

(72)発明者 古市 幸生
三重県亀山市本町 2 丁目 8 番 2 号

F ターム(参考) 4C088 AB59 AC04 BA09 BA10 BA37
CA02 CA05 CA06 CA08 CA11
CA17 NA14 ZB26 ZC41 ZC54