

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4971566号
(P4971566)

(45) 発行日 平成24年7月11日(2012.7.11)

(24) 登録日 平成24年4月13日(2012.4.13)

(51) Int. Cl. F I
C 0 7 H 1 5 / 2 6 (2 0 0 6 . 0 1) C O 7 H 1 5 / 2 6
A 6 1 K 3 1 / 7 0 4 8 (2 0 0 6 . 0 1) A 6 1 K 3 1 / 7 0 4 8
A 6 1 K 3 6 / 4 8 (2 0 0 6 . 0 1) A 6 1 K 3 5 / 7 8 J
A 6 1 P 3 5 / 0 0 (2 0 0 6 . 0 1) A 6 1 P 3 5 / 0 0

請求項の数 2 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2001-256107 (P2001-256107)	(73) 特許権者	390014904 井村屋グループ株式会社 三重県津市高茶屋七丁目1番1号
(22) 出願日	平成13年8月27日(2001.8.27)	(74) 代理人	100079050 弁理士 後藤 憲秋
(65) 公開番号	特開2003-63967 (P2003-63967A)	(74) 代理人	100098752 弁理士 吉田 吏規夫
(43) 公開日	平成15年3月5日(2003.3.5)	(72) 発明者	伊藤 裕子 三重県津市大字藤方2287-1-101
審査請求日	平成20年8月20日(2008.8.20)	(72) 発明者	古市 幸生 三重県亀山市本町2丁目8番2号
		(72) 発明者	小宮 孝志 愛知県名古屋市鳴子町5丁目1番7号
		(72) 発明者	樋▲廻▼ 博重 三重県安芸郡河芸町南黒田554番地 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗腫瘍性化合物

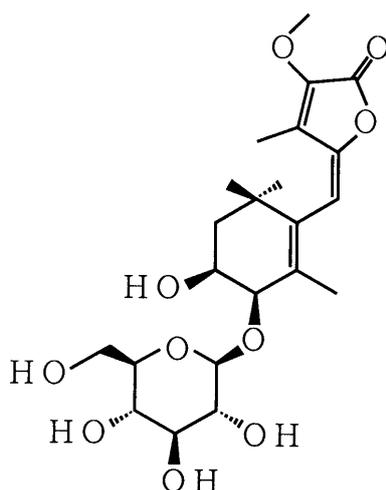
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

次の構造式(I)で表される化合物。

【化1】

(I)



【請求項2】

請求項 1 に記載の構造式 (I) で表される化合物が小豆抽出物より得られたものであることを特徴とする化合物。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

この発明は、癌予防剤および癌治療剤として有効な化合物に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

従来の癌治療薬には、化学療法剤として、アルキル化剤（シクロフォスファミド等）、代謝拮抗剤（アミノプテリン、メトトレキサート、シトシンアラビノシド、5 - フルオロウラシル等）、DNAトポイソメラーゼ阻害剤（カンプトテシン、ドキソルビシン等）、微小管阻害剤（ビンブラスチン、タキソール等）、抗生物質（プレオマイシン、マイトマイシンC等）、免疫賦活剤（クレスチン、ピシバニール等）、ラジカル発生剤（ヒドロキシウレア等）、各種ステロイドホルモン類が適宜利用されてきた。

【 0 0 0 3 】

しかし、前記の化学療法剤は、癌細胞や悪性腫瘍細胞等の病態細胞の除去効果が、未だ十分とは言い難かった。また、近年の健康食品ブームにより、合成化学薬品に代わって安心感の高い天然食品等の中から抗腫瘍効果の高いものが探し求められていた。

【 0 0 0 4 】

【発明が解決しようとする課題】

この発明は前記の点に鑑みなされたものであり、天然食品から得ることができる抗腫瘍性化合物を提供するものである。

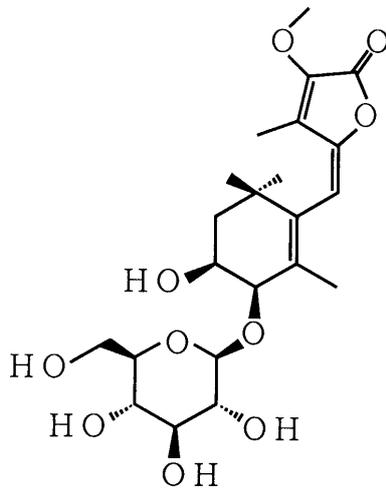
【 0 0 0 5 】

【課題を解決するための手段】

すなわち、請求項 1 の発明は、次の構造式 (I) で表される化合物に係る。

【化 2 】

(I)



【 0 0 0 6 】

請求項 2 の発明は、請求項 1 に記載の構造式 (I) で表される化合物が小豆抽出物より得られたものであることを特徴とする化合物に係る。

【 0 0 0 7 】

【発明の実施の形態】

本発明の抗腫瘍性化合物は、構造式 (I) で表される化学式 $C_{22}H_{32}O_{10}$ で示され、分子量が 456.20 の新規な化合物からなり、小豆の煮汁に由来するものである。また、本発明の抗腫瘍性化合物には、構造式 (I I) に示される炭素原子 C 1 6 - C 1 9 結合のまわりで回転した異性体が存在する。

10

20

30

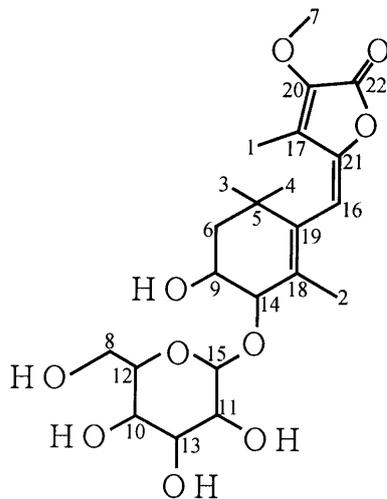
40

50

【 0 0 0 8 】

【 化 3 】

(II)



10

【 0 0 0 9 】

20

本発明の抗腫瘍性化合物は、小豆煮汁を用いて次のようにして製造される。使用される小豆煮汁は、小豆加工食品の製造において、小豆を煮沸する際に生じるものである。前記小豆煮汁を遠心分離し、上清をカラムに吸着させ、その吸着分をエタノールに溶出後、酢酸エチル/水による溶媒分配から酢酸エチル画分を得る。前記酢酸エチル画分に対し、TFA（トリフルオロ酢酸）・メタノール溶液への溶解、遠心分離、カラム吸着を繰り返し、最終フラクションをHPLCにより分取、単離すれば、本発明の抗腫瘍性化合物が得られる。

【 0 0 1 0 】

なお、本発明の抗腫瘍性化合物を医薬品として投与する方法は、経口、静脈等、特に問わない。また、本発明の抗腫瘍性化合物は、永年人間が摂食してきた小豆に由来するため、機能性食品として常時利用することで、発癌予防効果も期待できる。

30

【 0 0 1 1 】

【 実施例 】

以下に、本発明の抗腫瘍性化合物についてその実施例を、図1の概略工程図を用いて説明する。また、得られた本発明の抗腫瘍性化合物の培養細胞に対する効力を調べる実験を記述する。

【 0 0 1 2 】

(小豆煮汁からの単離)

小豆25kgに100kgの水を加え、20分間、0.5kg/cm²(0.49MPa)下で煮沸した後、小豆と他の不溶物を除去し、小豆煮汁を得た。得られた小豆煮汁を10倍濃縮し、小豆濃縮煮汁とした。前記小豆濃縮煮汁90kgを9000rpmで10分間、遠心分離(日立製作所製OPR-52を使用)した後、上清80kgと沈殿物に分離した。

40

【 0 0 1 3 】

前記上清1.5kgを芳香族系合成吸着剤(三菱化学株式会社製DIAION HP-20)に4のもと、12時間攪拌、吸着させた。前記上清が吸着した芳香族系合成吸着剤(DIAION HP-20)を水5L、40%エタノール2Lで溶出後、5×30cmの円筒状のカラムに充填し、40%エタノール1.5L、60%エタノール2L、80%エタノール1Lとエタノール濃度を段階的に上げ、それぞれの画分を得た。そのうち60%エタノール画分2Lをロータリーエバポレーター(ヤマト科学株式会社製RE-

50

400)により濃縮乾固した。一連の操作を繰り返し、前記上清80kgから21.4443gの濃縮乾固物を得た。前記濃縮乾固物を酢酸エチルと水による溶媒分配(酢酸エチル:水=1:1)に供し、酢酸エチル画分、水画分、沈殿物を得た。前記酢酸エチル画分を前記ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固し、乾固物4.4519gを得た。

【0014】

前記乾固物を0.1%トリフルオロ酢酸(以後TFAと表記)・水溶液450mlに溶解し、3000rpmで5分間遠心分離(トミー精工製RB-18IV)を行い、その沈殿物を0.1%TFA・50%メタノール溶液(50%メタノール溶液中に0.1%のTFAが存在する溶液)450mlに溶解した。前記0.1%TFA・50%メタノール溶液を3000rpmで5分間遠心分離し、上清を前記ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固し、乾固物2.4192gを得た。上記乾固物を再度0.1%TFA・50%メタノール溶液25mlに溶解し、3000rpmで10分間遠心分離した後、その上清を前記芳香族系合成吸着剤(DIAION HP-20)を充填したカラムに供した。

10

【0015】

前記カラムに、0.1%TFA・50%メタノール溶液、0.1%TFA・70%メタノール溶液(70%メタノール溶液に0.1%TFAが存在する溶液)、0.1%TFA・メタノール溶液(メタノール溶液に0.1%TFAが存在する溶液)と、メタノール濃度を段階的に上げた溶媒(各500mlずつ)を注入し、それぞれの画分を得た。

【0016】

前記0.1%TFA・70%メタノール溶液画分を前記ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固し、得られた乾固物897.0mgを50%メタノール3mlに溶解し、FUJISILYSIA CHEMICAL社製Chromatorexカラムにより分離し、10mlずつ分取、フラクションNo.55~60を回収した。

20

【0017】

前記フラクションNo.55~60を前記ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固し、乾固物52.3mgを得た。前記乾固物を30%アセトニトリル水溶液により、100mg/mlの濃度に調整し、日本分光製のHPLC(PU-1580, DG-1580-53, LG-1580-02, UV-1570)を用いて以下の条件のもと各フラクションをインジェクションした。この実施例において、HPLC分取用カラムは野村化学社製Develosil ODS-5 8.0x10mmを使用、緩衝液として30%アセトニトリルを1.5ml/分の流速で流通させ、検出器の吸光度を280nmに調整し、画分を逆相クロマトグラフィーにより分取した。

30

【0018】

リテンションタイム30分頃に検出されるピークの画分を再度、前述と同一の条件下において、HPLCにインジェクションした結果、再度リテンションタイム30分頃に単一のピークが確認できた。前記ピークの画分を前記ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固し、黄色粉末状からなる本発明の抗腫瘍性化合物7.8mgを単離した。

【0019】

物質の同定として、日本電子製のJMS-700マスペクトルを用い、エレクトロスプレーイオン法(ESI)と大気圧化学イオン化法(APCI)により質量分析を行った。また、日本分光社製の8900μによるIR分析、Varian社製UNITY INOVA 500による¹H-NMR, ¹³C-NMR分析を用いた。図2はIR分析結果のスペクトルを表す図、図3は¹H-NMR分析結果のスペクトルを表す図、図4は¹³C-NMR分析結果のスペクトルを表す図、図5はNMR分析においてNOE(核オーバーハウザー効果)の結果を示す第一図、図6はNMR分析においてNOE(核オーバーハウザー効果)の結果を示す第二図である。

40

【0020】

図2に示す赤外線吸収スペクトルのKBr錠剤中の主な吸収(cm^{-1})は、3400(OH基)、1770(五員環エステルのC=O基)、1640(C=C結合)、1080(C-O結合(C-OH, C-O-Cを含む))である。

50

【 0 0 2 1 】

図3のスペクトルは、 ^1H -NMR : 500 MHzにて、 CD_3OD を溶媒として内部基準物質にテトラメチルシランを用い、全値をppmとして以下の表1に示す。表中の帰属欄の番号は構造式(II)に示される炭素原子の番号を表し、図3のスペクトルの各ピークに付した番号と対応する。また、表中の記号は次のような意味を有する。s : シングレット、d : ダブルレット、t : トリプレット、dd : ダブルダブルレット、dt : ダブルトリプレット、m : マルチプレットである。

なお、表1において、構造式(II)および後述の構造式(III)として示される異性体が存在するため、各帰属に対してのピーク位置が2組(一対)のシグナルとして現れている。

10

【 0 0 2 2 】

【表1】

帰属	ピーク位置 (ppm)		^1H 化学シフト J (Hz)
1	1.93	2.01	3H, s
2	1.84	1.84	3H, s
3	1.05	1.15	3H, s
4	1.01	1.11	3H, s
6	1.57	1.59	1H, dd, J=3.5, 12.6
	1.92	1.93	1H, dd, J=12.5, 12.6
7	4.04	4.06	3H, s
8	3.69	3.69	1H, d, J=11.9
	3.86	3.87	1H, d, J=11.9
9	3.88		1H, m
	3.92		1H, dt, J=3.5, 12.5
10	3.29	3.29	1H, m
11	3.22	3.24	1H, dd, J=8.0, 9.0
12	3.29	3.29	1H, m
13	3.38	3.38	1H, m
14	3.99	4.03	1H, d, J=3.5
15	4.55	4.60	1H, d, J=8.0
16	6.05	6.07	1H, s

20

30

【 0 0 2 3 】

図4のスペクトルは、 ^{13}C -NMR : 125 MHzにて、 CD_3OD を溶媒として内部基準物質にテトラメチルシランを用い、全値をppmとして以下の表2に示す。表中の帰属欄の番号は構造式(II)に示される炭素原子の番号を表し、図4のスペクトルの各ピークに付した番号と対応する。また、原子団の欄に記した構造式は各帰属における炭素原子の結合様式を表現する。なお、表2においても表1と同様に、構造式(II)および後述の構造式(III)として示される異性体が存在するため、各帰属に対してのピーク位置が2組(一対)のシグナルとして現れている。

40

【 0 0 2 4 】

【表2】

帰属	ピーク位置 (ppm)		原子団
1	9.4	9.8	CH ₃
2	19.5	20.2	CH ₃
3	27.1	27.7	CH ₃
4	30.1	30.5	CH ₃
5	38.5	39.1	>C<
6	42.3	42.9	-CH ₂ -
7	59.5		CH ₃ -O
8	62.9	63.0	O-CH ₂ -
9	68.2	68.8	O-CH<
10	71.6	71.8	O-CH<
11	76.1	76.1	O-CH<
12	78.3	78.3	O-CH<
13	78.7	78.7	O-CH<
14	82.0	82.4	O-CH<
15	106.3	106.3	O-CH-O
16	111.6	111.7	>C=
17	128.7	129.8	>C=
18	131.5	132.2	>C=
19	137.2	137.3	>C=
20	146.3	146.7	O-C=
21	149.4	149.8	O-C=
22	165.1	165.4	>C=O

10

20

【0025】

30

図5のスペクトルは、NOE（核オーバーハウザー効果）の結果を示す。図5より、H4 - H1間にNOEが検出された。したがって、C1の炭素原子に結合する水素原子とC4の炭素原子に結合する水素原子は近接していることが示唆される。ゆえに、図2～5のスペクトル分析の結果より本発明の抗腫瘍性化合物は、構造式(I)と判断される。

【0026】

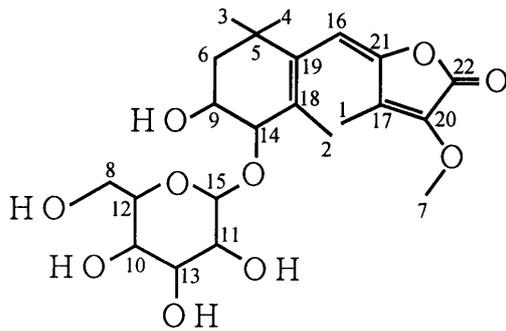
前記¹H-NMRおよび¹³C-NMR分析より、本試料のNMRスペクトルにおいて2組（対）のシグナルが観測され、さらに図6のNOE（核オーバーハウザー効果）スペクトルにおいて、H16を照射した際に、一方の異性体ではH3または、H4とのNOEが強く検出された。したがって、C16の炭素原子に結合する水素原子とC3またはC4の炭素原子に結合する水素原子は近接していることが示唆される。ゆえに、構造式(II)として示すC16 - C19結合まわりの軸異性が考えられる。

40

【0027】

【化4】

(III)



10

【0028】

(株化細胞の調整)

ヒト胃癌細胞：KATOIII (JTC-28)はAmerican Type Culture Collection (ATCC), Hearsh Science Research Resources Bank (HSRRB)より入手した。前記ヒト胃癌細胞：KATOIII (JTC-28)の培地は、10%牛胎児血清、ストレプトマイシン(50 μg/ml)、ペニシリンG(50 IU/ml)を含む45%RPMI 1640, 45%Eagle's minimal essentialの混合培地である。前記混合培地に濾過滅菌を施し、WAKENYAKU CO, Ltd製のCO₂インキュベーター MODEL-9100により、37℃、空気95.0%、炭酸ガス5.0%下にて5×10⁵個/mlの濃度に培養した。

20

【0029】

(本発明の抗腫瘍性化合物の効力の確認実験)

前記の方法で単離した本発明の抗腫瘍性化合物を、濃度が20 mg/mlになるよう、エタノールに溶解した。また、コントロールとして、エタノールのみを用意した。それぞれの調整済み溶液を株化細胞溶液2 ml (培地)に対し、最終濃度が250 μM, 500 μM, 750 μMになるように、前記本発明の抗腫瘍性化合物のエタノール溶液を添加し、37℃、空気95.0%、炭酸ガス5.0%下にて前記CO₂インキュベーターにより3日間培養した。

30

【0030】

(測定法)

血球計算板を用いて細胞数を計測し、コントロールとの比較から細胞増殖抑制率を(数1)の計算式より算出した。また、図7に掲げるように、本発明の抗腫瘍性化合物は、細胞増殖抑制効果を発現した。

【0031】

【数1】

$$\text{細胞増殖抑制率(\%)} = \left[1 - \frac{\text{培養後のサンプル添加処理の細胞数} \times \text{培養前のコントロールの細胞数}}{\text{培養後のコントロールの細胞数} \times \text{培養前のコントロールの細胞数}} \right] \times 100$$

40

【0032】

【発明の効果】

以上図示し説明したように、この発明の抗腫瘍性化合物によれば、ヒト胃癌細胞：KATOIII (JTC-28)に対して、細胞増殖抑制効果が得られる。

【0033】

50

また、この発明の抗腫瘍性化合物は、食品として安全性が確かな小豆の加工段階で得られる煮汁を原料としているため、食品と同様の感覚で安心して摂取することができるため、日常のおよび継続的な癌の予防および治療に最適である。

【0034】

さらに、この発明によれば、従来は廃棄物として処理されていた前記煮汁を原料として、新たな癌の予防薬や治療薬、機能性食品等に利用できる抗腫瘍性化合物が得られるため、原料が安価に入手でき、さらに廃棄物処理にも貢献できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の抗腫瘍性化合物を小豆抽出物より得る方法を示す概略工程図である。

【図2】 本発明の抗腫瘍性化合物のIRスペクトルを表す図である。

【図3】 本発明の抗腫瘍性化合物の¹H-NMRスペクトルを表す図である。

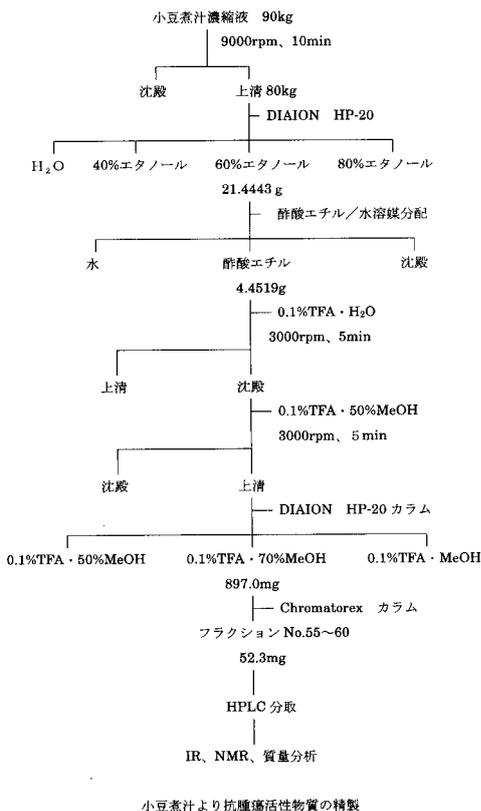
【図4】 本発明の抗腫瘍性化合物の¹³C-NMRスペクトルを表す図である。

【図5】 本発明の抗腫瘍性化合物のNMR分析においてNOE（核オーバーハウザー効果）の結果を示す第一図である。

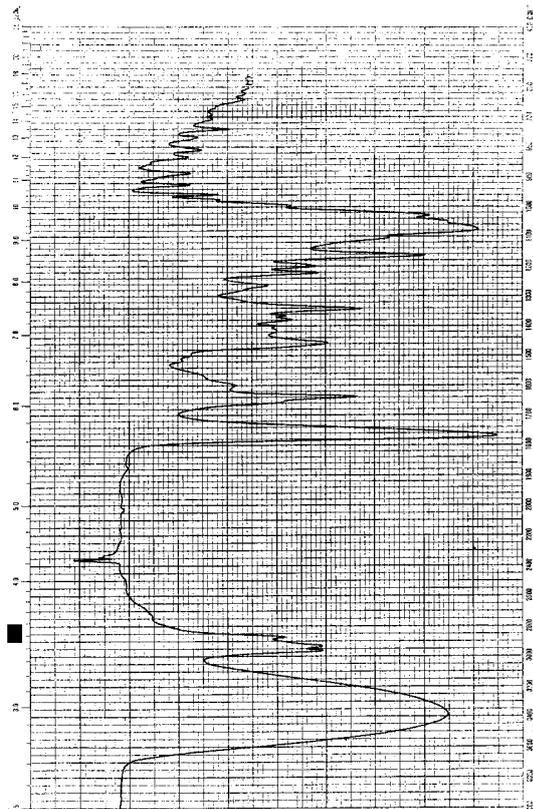
【図6】 本発明の抗腫瘍性化合物のNMR分析においてNOE（核オーバーハウザー効果）の結果を示す第二図である。

【図7】 本発明の抗腫瘍性化合物の投与による株化細胞KATOIII（JTC-28）に対する増殖抑制効果を示すグラフである。

【図1】

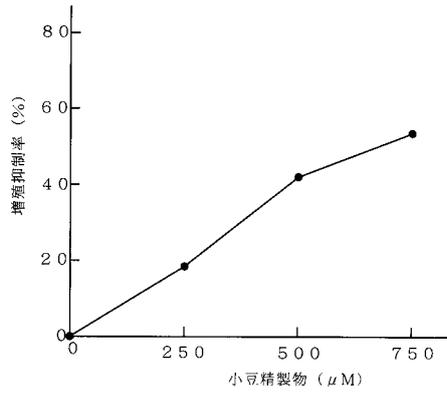


【図2】



【図7】

小豆精製物のヒト胃癌細胞への
増殖抑制効果



フロントページの続き

審査官 井上 明子

(56)参考文献 Cancer Biother. Radiopharm. , 1997年, Vol.12, No.4 , p.277-280

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07H 15/26

A61K 31/7048

A61K 36/48

CAplus(STN)

REGISTRY(STN)

JSTPlus(JDreamII)