

200918040A

厚生労働科学研究費補助金

臨床研究推進研究事業

医療技術実用化総合研究事業

「新しく発明された概念に基づく
抗がん剤アルクチゲニンの臨床導入」
に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 江角 浩安

平成22 (2010) 年 9月

差換え版

目 次

I. 総括研究報告

新しく発明された概念に基づく抗がん剤アルクチゲニンの臨床導入 江角 浩安	----- 1
---	---------

II. 分担研究報告

1. 臨床導入の統括とTRの実施及び統括 江角 浩安	----- 7
2. 臨床試験の計画及び統括 大津 敦	----- 14
3. 臨床試験の計画、臨床試験実施支援 佐藤 暁洋	----- 16
4. 臨床試験の実施 池田 公史	----- 18
5. 臨床試験の実施 奥坂 拓志	----- 20
6. 臨床試験の実施 畠 清彦	----- 22

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 24
---------------------	----------

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）

（総括）研究報告書

新しく発明された概念に基づく抗がん剤アルクチゲニンの臨床導入

研究代表者 江角浩安

独立行政法人国立がん研究センター東病院 理事長付

研究要旨

既存の抗がん剤は、酸素や栄養供給が不足している腫瘍組織では有効性が極端に低くなるが、この微小環境下で最大の効果を得られる、正常組織に低毒性の抗腫瘍薬をスクリーニングしキガマイシン、アルクチゲニンなどを見いだした。本研究では、局方に登録されたゴボウシ抽出エキスにアルクチゲニンが多く含まれる事に注目し、アルクチゲニンと同じ効果を得られるかを検討した。臨床ですい臓がんに対する標準治療薬として用いられているゲムシタピンあるいはTS-1との併用効果についても検討し、早期の臨床導入をめざし、前臨床試験を実施した。その結果、多くの細胞腫で抗腫瘍性を認めた。ゲムシタピンあるいはTS-1との併用では明らかに抗腫瘍効果が増強され、また、単独での毒性及びゲムシタピンとの併用による毒性は2週連続投与で見ると特記するほどのものはなかった。早期の臨床導入をめざし、前臨床試験を追加実施すると共に臨床試験のためのプロトコールの検討をした。

分担研究者氏名及び所属施設

江角浩安 国立がん研究センター東病院
大津 敦 国立がん研究センター東病院
佐藤暁洋 国立がん研究センター東病院
池田公史 国立がん研究センター東病院
奥坂拓志 国立がん研究センター中央病院
畠 清彦 癌研究会有明病院

A. 研究目的

既存の抗がん剤は、酸素供給や栄養供給が不足している腫瘍組織では有効性が極端に低くなることを報告してきた。そこで我々は、そういった腫瘍組織の微小環境下で細胞障害性を最大に発揮する物質の探索を目的として、がん組織に特異的なエネルギー代謝系を標的とした、正常組織に対して相対的に低毒性の抗腫瘍薬をスクリーニングしてきた。

天然物の中からこれまでにキガマイシン、アルクチゲニンなどを見いだしてきたが、本研究では、既に局方薬として登録されているゴボウシにアルクチゲニンが多く含まれる事に注目し、ゴボウシ抽出エキスによって、精製アルクチゲニンと同じ効果を得られる

事を確認し、さらに臨床ですい臓がんに対する標準治療薬として用いられているゲムシタピン、TS-1との併用効果についても検討し、早期の臨床導入を目的とした。

B. 研究方法

前臨床試験

ヒト由来の膵臓がん細胞株である AsPc1、BxPc3、CAPAN1、CAPAN2、CFPAC、MIAPaCa2、PANC1、PSN1、Su8686、KP3 の10株用いたゼノグラフトで抗腫瘍性を検討した。

牛蒡子抽出エキスは、クラシエ製薬でGMPグレードで調製し供給を受けた。細胞の実験には、ジメチルスルフォキシド（DMSO）で用時溶解したものを培地の1/100量で添加した。動物に投与する際は、0.5%のカルボキシメチルセルロースで懸濁したものをを用いた。ゲムシタピンはイーライリリー社より購入し、生理食塩水で希釈して細胞および動物実験に用いた。

細胞の培養条件

すい臓がん細胞株の培養には、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; CAPAN1、CAPAN2、CFPAC、MIAPaCa2、PANC1) または、RPMI1640 (AsPc1、BxPc3、

PSN 1、KP3、Su8686) に 2.5 mM HEPES (pH7.4)、1/100 量の non essential amino acid, 200 mM L-glutamine、抗生物質に 10% 血清を加えた培地に NaHCO₃ で最終 pH を 7.4 に調整したものをを用いた。

栄養欠乏培地は、Sigma 社製の DMEM-base に 2.5 mM HEPES (pH7.4)、1/100 量の non essential amino acid, 200 mM L-glutamine、および抗生物質に 10% の透析血清を加えたものを通常培地と同様に NaHCO₃ で最終 pH を 7.4 に調整して用いた。

細胞への傷害性の評価

細胞は、96 穴プレートへ 1 穴あたり 10,000 個播種した。24 時間後に培地を除去し、通常栄養培地または栄養欠乏培地に置き換え、それぞれに 10 倍または 5 倍で段階希釈したアルクチゲニンまたはゲムシタピンを加えた。添加の 72 時間後に WST-8 (Dojindo) キットで比色定量し、理論に算出された細胞数から細胞生存率を評価した。

マウス臓がん細胞移植モデルの作製

マウスの皮下への移植には、細胞の実験に用いた 10 種類の細胞株を用いた。各腫瘍細胞株、それぞれ 500,000 個をヌードマウスの背皮下に移植して、経時的に腫瘍体積を測定した。アルクチゲニンおよびアルクチゲニン含有エキスは、週に 5 回、0.5 mg/kg から 5.0 mg/kg の量でゾンデを用いて経口的に胃内投与した。ゲムシタピンは、週に 1 回 100 mg/kg を腹腔内投与した。

遺伝的すい臓がん発症モデルの作製

遺伝的なすい臓がんモデルを作製するため、3 種類のトランスジェニックマウス

(*Ptfla^{cre/+}*、*LSL-Kras^{G12D/+}*、*Tgfbr2^{fllox/fllox}*)

を入手した (Vanderbilt University, Dr. Moses HL 研究室より)。これらを交配し、Cre-LoxP システムを用いて、すい臓特異的に TGFβ Type II Receptor をノックアウトすると同時に Ras を強制発現させることによって、すい臓がんマウスモデルを作製した。交配によって仔を得た後、各個体の組織から DNA を抽出し、PCR 法で遺伝子型を調べた。TGFβ のラインは、ホモで維持し、Ras と

PtflaCre のマウスを交配して 2 遺伝子にトランスジェニックポジティブのマウスを作製し、さらにこれら同士の交配によって 3 遺伝子がポジティブのマウスを得た。アルクチゲニンは、マウス通常固形飼料 (MF) に 0.04% で添加し、自由摂取させた。

急性及び亜急性毒性試験

アルクチゲニンに関してマウス一匹あたり、5, 50, 500 μgram を単回経口投与した。ゲムシタピンとの併用に関してはゲムシタピンを 100mg/kg となるように投与した。経時的に 2 週目まで、血算、肝機能、腎機能検査と体重変化、最後に屠殺し病理組織学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、国立がんセンターでの動物実験に関する審査を受けて行っているが、今後も同様に行う必要がある。臨床試験に関しては、プロトコールができ次第倫理審査委員会に提出しその審査を受ける。UMIN 等で臨床試験登録を行う。

C. 研究結果

皮下移植モデルマウスにおけるアルクチゲニンとゲムシタピンとの併用効果

ゲムシタピンとアルクチゲニンとでは、薬効を示す細胞のおかれた微小環境が異なることが考えられる。一方、ヒトでも動物でも腫瘍組織は同一腫瘍組織内でも微小環境は極めて不均一である。従って、この複雑な微小環境においては、ゲムシタピンとアルクチゲニン、あるいは TS-1 とアルクチゲニンの併用によってより大きな効果が期待された。そこで動物ゼノグラフト系でゲムシタピンあるいは TS-1 との併用について検討した。

本実験には、増殖速度が比較的緩やかで組織内の細胞の壊死が少ない MIAPaCa-2 (JCRB) および CAPAN-1 細胞を用いた。

ゲムシタピンは、被験物質全量を生理食塩液 6.7 mL で溶解し、100 mM 溶液を調製し、これを保存溶液とした。投与検体は、2.01 mL の 100 mM 溶液に生理食塩液 0.99 mL を加え、20 mg/mL 溶液とした。被験薬物ゲムシタピンの保存溶液は分注し -30°C に保存した。投与検体は用時調製し、調整後直ちに使用した。

TS-1 は被験物質 72.51 mg を秤量し、0.5%CMC 水溶液を加えて全量を 16 mL にし、超音波処理により原末を完全に溶解させた。使用するまで 4°C に保存した。

アルクチゲニン含有エキスはアルクチゲニン含有エキス 219.2 mg (アルクチゲニン 25 mg 当量) を秤量し、2.5 mL の 1%CMC で溶解後、超純水で総量 5 mL とした。

平均腫瘍サイズが 200-300 mm³ 程度になった時点で各群の腫瘍サイズが均一になるよう選別・群分け (各群 10 匹) を行った。尚、腫瘍サイズは以下計算式により算出した。

腫瘍サイズ Tomor Volume (mm³) = $\frac{4}{3} \times \pi \times L/2 \times W/2 \times W/2$

(L: 腫瘍長径[mm], W: 腫瘍短径[mm])

群構成表の条件に従って薬剤投与を 28 日間行った。この間、腫瘍サイズおよび体重を 1 週間に 2 回の頻度で測定し、一般症状観察 (月~金曜日) を行った。

MIaPaCa 細胞の場合は、群分けは移植日より 27 日目に行い、同日投与を開始した。

1) 一般症状観察

実験期間中、動物に特に異常は認められなかった。

2) 体重

実験期間中、特に異常は認められなかった。腫瘍サイズ

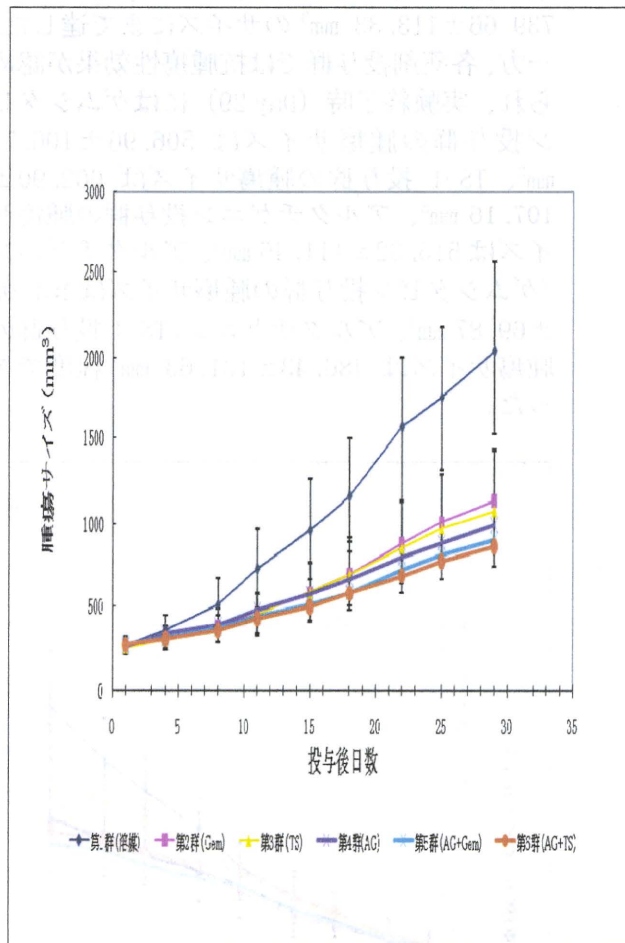
溶媒投与群では著しい腫瘍増殖が認められ、実験終了時 (Day 29) には 2041.96 ± 546.87 mm³ のサイズにまで達した。一方、各薬剤投与群では抗腫瘍性効果が認められ、実験終了時 (Day 29) にはゲムシタビン投与群の腫瘍サイズは 1140.43 ± 314.38 mm³、TS-1 投与群の腫瘍サイズは 1084.60 ± 362.61 mm³、アルクチゲニン投与群の腫瘍サイズは 997.88 ± 367.60 mm³、アルクチゲニン/ゲムシタビン投与群の腫瘍サイズは 905.36 ± 279.32 mm³、アルクチゲニン/TS-1 投与群の腫瘍サイズは 868.26 ± 225.40 mm³ 程度であった。

腫瘍サイズの変化を 6 群間で比較したところ、Day 15 以降で溶媒投与群に対して各薬剤投与群で有意な腫瘍増殖の抑制が認められた。

しかし、各薬剤投与群間の比較では、有

意な差が認められなかった。

MIaPaCa 細胞での結果を図示する。



同様の検討を CAPAN-1 細胞を用いて行った。

CAPAN-1 細胞は、ヌードマウスに細胞移植前に細胞培養フラスコ (培養面積 225 cm²) あたり 4.8 x 10⁶ 個の細胞を培養した。移植時、総細胞 5.60 x 10⁸ 個回収され、そのうち生細胞は 5.55 x 10⁸ 個で生存率は 99.1% であった。

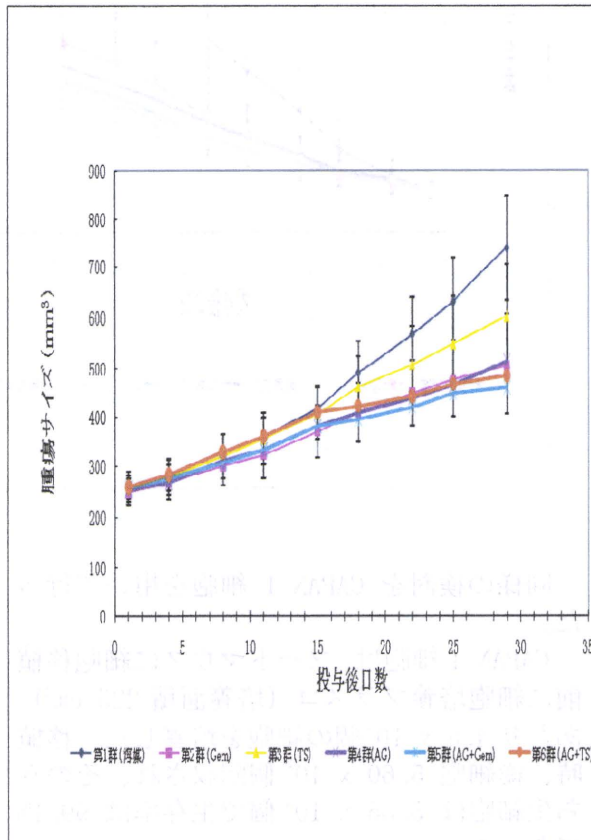
群分けは移植日より 33 日目に行い、同日投与を開始した。

前の実験と同様に、一般症状観察で実験期間中、動物に特に異常は認められなかった。また、体重に関しても実験期間中、特に異常は認められなかった。

腫瘍サイズに関しては、各群とも Day 15

までは緩やかな腫瘍増殖を示し、それらの腫瘍サイズに大きな違いは見られなかった。

Day 15 以降、溶媒投与群では著しい腫瘍増殖が認められ、実験終了時 (Day 29) には $739.66 \pm 113.33 \text{ mm}^3$ のサイズにまで達した。一方、各薬剤投与群では抗腫瘍性効果が認められ、実験終了時 (Day 29) にはゲムシタピン投与群の腫瘍サイズは $506.96 \pm 106.77 \text{ mm}^3$ 、TS-1 投与群の腫瘍サイズは $602.90 \pm 107.16 \text{ mm}^3$ 、アルクチゲニン投与群の腫瘍サイズは $515.32 \pm 111.46 \text{ mm}^3$ 、アルクチゲニン/ゲムシタピン投与群の腫瘍サイズは $461.05 \pm 69.87 \text{ mm}^3$ 、アルクチゲニン/TS-1 投与群の腫瘍サイズは $486.43 \pm 131.63 \text{ mm}^3$ 程度であった。



各群の腫瘍サイズの変化。平均値 ± 標準偏差 (n=10) で示す。Day 1 : 投与開始日。

腫瘍サイズの変化を 6 群間で比較したところ、TS-1 は Day 29 で、その他の薬剤は Day 18~Day 22 以降で溶媒投与群に対して有意な腫瘍増殖の抑制が認められた。

各薬剤単独投与群間の比較では、TS-1 よりゲムシタピンおよびアルクチゲニンの方が効果は大きく、ゲムシタピンおよびアルク

チゲニン間では差はなかった。

薬剤併用群に関しては、アルクチゲニン/TS-1 併用は TS-1 単独に対して有意な併用治療効果が認められた

急性及び亜急性毒性試験

アルクチゲニンおよびゲムシタピン併用療法の臨床試験に先立ち、アルクチゲニンの 2 週間連続経口投与およびゲムシタピン 2 週間における 1 回/週腹腔内投与ならびに両薬併用時の急性毒性試験を一般症状観察、体重測定、毒性評価パラメーターの測定ならびに病理組織学的検査を指標に実施した。

アルクチゲニン含有エキス 87.8 mg (アルクチゲニン 10 mg 当量) を秤量し、1 mL の 1% CMC で溶解後、超純水で総量 2 mL とし、500 · g/0.1 mL を調製した。被験薬物アルクチゲニン含有エキスの投与検体は用時調製し、調整後直ちに使用した。

ジェムザール注射用 200 mg 全量を生理食塩液 6.7 mL で溶解し、100 mM 溶液を調製し、これを保存溶液とした。保存溶液は分注し -30°C に保存した。投与の際に、2.01 mL の 100 mM 溶液に生理食塩液 0.99 mL を加えて 20 mg/mL 溶液の投与薬液とした。投与薬液は用時調製し、調整後直ちに使用した。

動物は、Cr1j:CD1 ICR マウスを用いた。6 週齢で実験施設に搬入し、一週間の馴化のの地試験を行った。

アルクチゲニン含有エキスは 2 週間経口投与した。また、ゲムシタピンは 1 週間に 1 回腹腔内投与した。実験期間中、一般症状観察及び体重測定を行った。投与開始日および投与開始後 2 週目に血液を採取した。また、採血後、剖検し必要な器官・組織を摘出した。

外部業者に委託して血液生化学的検査及び組織切片作製を行った

マウス一般症状観察 : 1 週間のうち 5 日間観察した。

体重測定：投与開始日、投与開始後1週目および2週目に測定した。血液学的検査：投与直前（ゼロポイント群）および投与開始後2週目に採血し、赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、白血球数(WBC)、血小板数(PLT)をセルタックα（日本光電工業株式会社）で測定した。

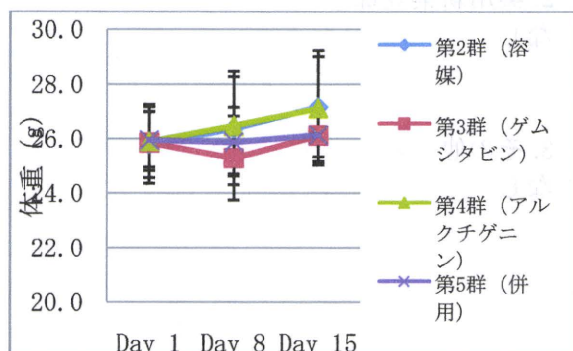
血液生化学的検査：投与直前および投与開始後2週目に採血し、血漿中の総蛋白、アルブミン、グロブリン、A/G比、グルコース、総コレステロール、トリグリセリド、尿素窒素、クレアチニン、AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、ナトリウム、カリウム、クロールを測定した（財団法人食品農医薬品安全性評価センターに委託）。

器官・組織重量測定：投与直前（ゼロポイント群）および投与開始後2週目の採血後、全例の心臓、肺、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓（左右）の重量を測定した。

病理解剖学的検査：投与直前（ゼロポイント群）および投与開始後2週目の採血後、全例の胸腹腔内を肉眼観察し、代表例1匹/1群及び異常の認められた個体の心臓、肺、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、骨髄（大腿骨）、食道、胃・十二指腸、空腸、回腸、結腸、直腸を採取し固定した。ヘマトキシリン・エオシン（HE）染色、TUNEL染色、および未染色標本を作製した（株式会社ジェノスタッフに委託）。

病理組織学的検査（所見）：胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、骨髄、巨核細胞数

体重変化



併用によりゲムシタピンの体重変化に対する増強は見られなかった。

一般症状、臨床検査いずれにおいても、ゲムシタピンの影響を増強することはなかった。

臨床試験のためのプロトコール研究

1. 現在までの前臨床試験は膵臓がんに特化したものであるが、将来の事を考えれば膵臓がん以外への応用も考え他の細胞株、他の動物モデルでの抗腫瘍性の検討を追加するのが望ましい。また、ヒトでの薬物動態と同じように抗腫瘍性を示す投与量での動物の薬物動態を検討する必要がある。動物での薬物動態試験には血中濃度測定のため、感度を改良する必要があり LC-UV の検出系を LC-MAS に変更中である。
2. POC のためのバイオマーカーを考える必要があるが、メタボローム、PET、Diffusion-weighted MRI 等を検討する
3. Phase I 試験は、単に Pharmacokinetics に止まらず単剤での抗腫瘍効果も End-point とするのがよい。これがないと、牛蒡子の適応症がゲムシタピンあるいは TS-1 との併用だけで認められると将来の展開が苦しくなる。出来るだけ早い時期に PMDA との相談をする。
4. いずれにしろ大きな困難があるとは思えないのでエキスとしての臨床試験のデザインをする。

D. 考察

前臨床試験

精製アルクチゲニンおよびゴボウシから得られた粗抽出エキスをを用いた検討の結果、通常栄養培地においては、細胞障害性がみられなかったのに対して、腫瘍の微小環境を模倣した栄養欠乏培地では、アルクチゲニンの含量に従った抗腫瘍活性がみられた。また、ゴボウシの粗抽出物は、精製アルクチゲニンと同等の抗腫瘍活性を持つことが *in vitro* および *in vivo* の研究結果から明らかになっ

た。栄養飢餓状態に選択的なアルクチゲニンの細胞障害性は、遺伝的背景の異なる膵臓がん細胞株において広く見られたことから、特異な遺伝子系に働くのではなく、栄養状態など、微小環境に依存した変化によって細胞内で起こる代謝系などに作用していることが示唆された。

現在の前臨床試験での弱点は、ヒトでの薬物動態解析に関しては初歩的とはいえ十分に期待の持てる結果が出ているが、これに相当する動物モデルでの薬物動態試験が遅れていることである。至適投与量を算出する上では薬物動態が最も信頼性の高いデータになると思われるのでこの部分の補強が急がれる。

アルクチゲニンとゲムシタピンさらにTS-1との併用効果を動物モデルにおいて検討したところ、併用によってより大きな抗腫瘍性を発揮することが明らかになった。しかしながら、ゲムシタピンとアルクチゲニンが実際に異なる環境で作用しているのかについては、本研究の中で明らかにできなかったため、今後動物モデルを用いて実証していく必要があると考えられる。

21年度の研究で二つのモデルの動物実験の結果、移植モデルよりも実際のすい臓がんの病態に近いことが報告されている遺伝的すい臓がん発症モデルにおいて、実験個体数が少ないものの病態の進展が明らかに抑えられていることや延命効果が顕著であることは、アルクチゲニンの潜在的な可能性を示していると思われる。今回の牛蒡子エキスの臨床導入に限らず、栄養飢餓体制制御薬の作用機序の解明と、臨床でより広く使われるようにするためには、モデルの改良、開発にも取り組む、よりわかりやすいPOCのためのモデルを作る必要がある。

アルクチゲニンは、従来の抗がん剤とは、異なる作用機序によって抗腫瘍効果を示すことから、従来の抗がん剤では、効果の薄かったがんに対して有効な治療薬となる可能性があると考えられた。

急性及び亜急性毒性試験に関しては特に取り立てて大きな毒性は見られなかった。また、ゲムシタピンとの併用によっても、ゲムシタピンの毒性を大きく増強するような反応は見られなかった。臨床試験を行う上で毒性の問題は慎重に検討される必要がある。

E. 結論

臨床試験のための検討の結果は今後の方針でもある、再度記述をする。1. 現在までの前臨床試験は膵臓がんの特化したものであるが、将来の事を考えれば膵臓がん以外への応用も考え他の細胞株、他の動物モデルでの抗腫瘍性の検討を追加するのが望ましい。2. POCのためのバイオマーカーを考える必要があるが、メタボローム、PET、Diffusion-weighted MRI等も検討する3. Phase I試験は、単にPharmacokineticsに止まらず単剤での抗腫瘍効果もEnd-pointとするのがよい。これがないと、牛蒡子の適応症がゲムシタピンあるいはTS-1との併用だけで認められると将来の展開が苦しくなる。出来るだけ早い時期にPMDAとの相談をする。4. いずれにしろ大きな困難があるとは思えないのでエキスとしての臨床試験のデザインを急ぐ必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

研究の刊行に関する一覧表に記載。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 江角浩安 アルクチゲニン高含有ゴボウシエキス及びその製造方法
出願番号[2010-505497]

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）

（総括）研究報告書

臨床導入の統括と TR の実施及び統括

研究（代表）分担者 江角浩安

独立行政法人国立がん研究センター東病院 理事長付

研究要旨

既存の抗がん剤は、酸素や栄養供給が不足している腫瘍組織では有効性が極端に低くなるが、この微小環境下で最大の効果を得られる、正常組織に低毒性の抗腫瘍薬をスクリーニングしキガマイシン、アルクチゲニンなどを見いだした。本研究では、局方に登録されたゴボウシ抽出エキスにアルクチゲニンが多く含まれる事に注目し、アルクチゲニンと同じ効果を得られるかを検討した。臨床ですい臓がんに対する標準治療薬として用いられているゲムシタピンあるいは TS-1 との併用効果についても検討し、早期の臨床導入をめざし、前臨床試験を実施した。その結果、多くの細胞腫で抗腫瘍性を認めた。ゲムシタピンあるいは TS-1 との併用では明らかに抗腫瘍効果が増強され、また、単独での毒性及びゲムシタピンとの併用による毒性は 2 週連続投与で見ると特記するほどのものはなかった。早期の臨床導入をめざし、前臨床試験を追加実施すると共に臨床試験のためのプロトコールの検討をした。

分担研究者氏名及び所属施設

江角浩安 国立がん研究センター東病院
大津 敦 国立がん研究センター東病院
佐藤暁洋 国立がん研究センター東病院
池田公史 国立がん研究センター東病院
奥坂拓志 国立がん研究センター中央病院
梶 清彦 癌研究会有明病院

A. 研究目的

既存の抗がん剤は、酸素供給や栄養供給が不足している腫瘍組織では有効性が極端に低くなることを報告してきた。そこで我々は、そういった腫瘍組織の微小環境下で細胞障害性を最大に発揮する物質の探索を目的として、がん組織に特異的なエネルギー代謝系を標的とした、正常組織に対して相対的に低毒性の抗腫瘍薬をスクリーニングしてきた。

天然物の中からこれまでにキガマイシン、アルクチゲニンなどを見いだしてきたが、本研究では、既に局方薬として登録されているゴボウシにアルクチゲニン

が多く含まれる事に注目し、ゴボウシ抽出エキスによって、精製アルクチゲニンと同じ効果を得られる事を確認し、さらに臨床ですい臓がんに対する標準治療薬として用いられているゲムシタピン、TS-1 との併用効果についても検討し、早期の臨床導入を目的とした。

B. 研究方法

前臨床試験

ヒト由来の膵臓がん細胞株である AsPc1、BxPc3、CAPAN1、CAPAN2、CFPAC、MIAPaCa2、PANC1、PSN1、Su8686、KP3 の 10 株用いたゼノグラフトで抗腫瘍性を検討した。

牛蒡子抽出エキスは、クラシエ製薬で GMP グレードで調製し供給を受けた。細胞の実験には、ジメチルスルフォキシド（DMSO）で用時溶解ししたものを培地の 1/100 量で添加した。動物に投与する際は、0.5% のカルボキシメチルセルロースで懸濁したものをを用いた。ゲムシタピンはイーライリリー社より購入し、生理食塩水で希釈して細胞および動物実験に用いた。

細胞の培養条件

すい臓がん細胞株の培養には、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; CAPAN1, CAPAN2, CFPAC, MIAPaCa2, PANC1) または、RPMI1640 (AsPc1, BxPc3, PSN 1, KP3, Su8686) に 2.5 mM HEPES (pH7.4)、1/100 量の non essential amino acid, 200 mM L-glutamine、抗生物質に 1.0% 血清を加えた培地に NaHCO_3 で最終 pH を 7.4 に調整したものを用いた。

栄養欠乏培地は、Sigma 社製の DMEM-base に 2.5 mM HEPES (pH7.4)、1/100 量の non essential amino acid, 200 mM L-glutamine、および抗生物質に 1.0% の透析血清を加えたものを通常培地と同様に NaHCO_3 で最終 pH を 7.4 に調整して用いた。

細胞への傷害性の評価

細胞は、96 穴プレートへ 1 穴あたり 10,000 個播種した。24 時間後に培地を除去し、通常栄養培地または栄養欠乏培地に置き換え、それぞれに 10 倍または 5 倍で段階希釈したアルクチゲニンまたはゲムシタピンを加えた。添加の 72 時間後に WST-8 (Dojindo) キットで比色定量し、理論に算出された細胞数から細胞生存率を評価した。

マウス臓がん細胞移植モデルの作製

マウスの皮下への移植には、細胞の実験に用いた 10 種類の細胞株を用いた。各腫瘍細胞株、それぞれ 500,000 個をヌードマウスの背皮下に移植して、経時的に腫瘍体積を測定した。アルクチゲニンおよびアルクチゲニン含有エキスは、週に 5 回、0.5 mg/kg から 5.0 mg/kg の量でゾンデを用いて経口的に胃内投与した。ゲムシタピンは、週に 1 回 100 mg/kg を腹腔内投与した。

遺伝的すい臓がん発症モデルの作製

遺伝的すい臓がんモデルを作製するため、3 種類のトランスジェニックマウス (*Ptfla^{cre/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*, *Tgfbr2^{fllox/fllox}*) を入手した (Vanderbilt University, Dr. Moses HL 研究室より)。これらを交配し、Cre-LoxP システムを用いて、すい臓特異的に TGF β Type II Receptor をノックアウトすると同時に Ras を強制発現させることによって、すい臓がんマウスモデルを作製した。交配によって仔を得た後、各個体の組織から DNA を抽出し、PCR 法で遺伝子型を調べた。TGF β のラインは、ホモで維持し、Ras と *PtflaCre* のマウスを交配して 2 遺伝子にトランスジーンポジティブのマウスを作製し、さらにこれら同士の交配によって 3 遺伝子がポジティブのマウスを得た。アルクチゲニンは、マウス通常固形飼料 (MF) に 0.04% で添加し、自由摂取させた。

急性及び亜急性毒性試験

アルクチゲニンに関してマウス一匹あたり、5, 50, 500 μ gram を単回経口投与した。ゲムシタピンとの併用に関してはゲムシタピンを 100mg/kg となるように投与した。経時的に 2 週目まで、血算、肝機能、腎機能検査と体重変化、最後に屠殺し病理組織学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、国立がんセンターでの動物実験に関する審査を受けて行っているが、今後も同様に行う必要がある。臨床試験に関しては、プロトコールができ次第倫理審査委員会に提出しその審査を受ける。UMIN 等で臨床試験登録を行う。

C. 研究結果

皮下移植モデルマウスにおけるアルクチゲニンとゲムシタピンとの併用効果

ゲムシタピンとアルクチゲニンとは、薬効を示す細胞のおかれた微小環境が異なることが考えられる。一方、ヒトでも動物でも腫瘍組織は同一腫瘍組織内でも微小環境は極めて不均一である。従って、

この複雑な微小環境においては、ゲムシタピンとアルクチゲニン、あるいは TS-1 とアルクチゲニンの併用によってより大きな効果が期待された。そこで動物ゼノグラフト系でゲムシタピンあるいは TS-1 との併用について検討した。

本実験には、増殖速度が比較的緩やかで組織内の細胞の壊死が少ない MIA PaCa-2 (JCRB) および CAPAN-1 細胞を用いた。

ゲムシタピンは、被験物質全量を生理食塩液 6.7 mL で溶解し、100 mM 溶液を調製し、これを保存溶液とした。投与検体は、2.01 mL の 100 mM 溶液に生理食塩液 0.99 mL を加え、20 mg/mL 溶液とした。被験薬物ゲムシタピンの保存溶液は分注し-30°C に保存した。投与検体は用時調製し、調整後直ちに使用した。

TS-1 は被験物質 72.51 mg を秤量し、0.5%CMC 水溶液を加えて全量を 16 mL にし、超音波処理により原末を完全に溶解させた。使用するまで 4°C に保存した。

アルクチゲニン含有エキスはアクチゲニン含有エキス 219.2 mg (アクチゲニン 25 mg 当量) を秤量し、2.5 mL の 1%CMC で溶解後、超純水で総量 5 mL とした。

平均腫瘍サイズが 200-300 mm³ 程度になった時点で各群の腫瘍サイズが均一になるよう選別・群分け (各群 10 匹) を行った。尚、腫瘍サイズは以下計算式により算出した。

$$\text{腫瘍サイズ Tomor Volume (mm}^3\text{)} = 4/3 \times \pi \times L/2 \times W/2 \times W/2$$

(L: 腫瘍長径 [mm], W: 腫瘍短径 [mm])

群構成表の条件に従って薬剤投与を 28 日間行った。この間、腫瘍サイズおよび体重を 1 週間に 2 回の頻度で測定し、一般症状観察 (月~金曜日) を行った。

MIA PaCa 細胞の場合は、群分けは移植日より 27 日目に行い、同日投与を開始した。

実験期間中、動物に特に異常は認められなかった。実験期間中、特に異常は認められなかった。腫瘍サイズ

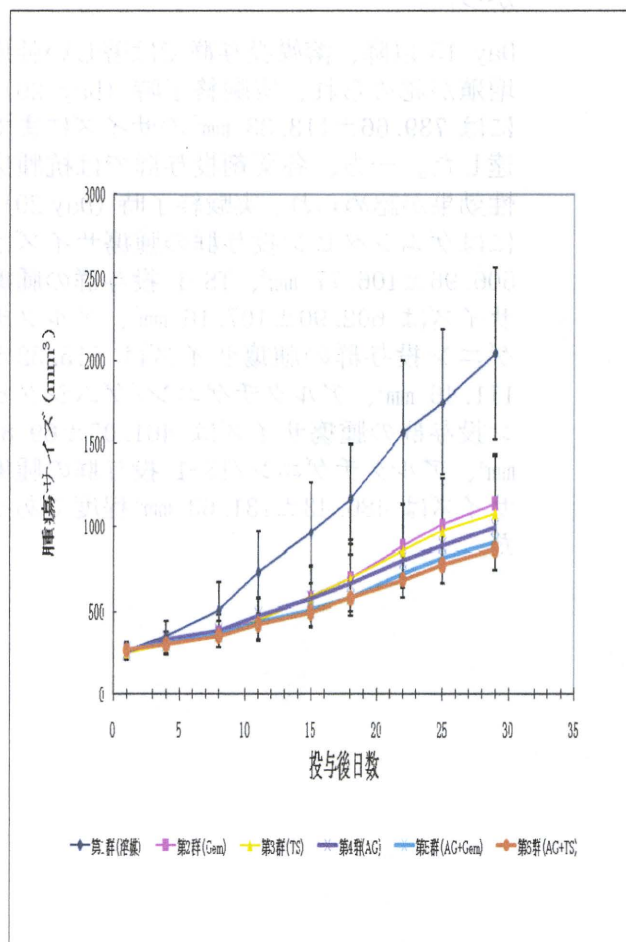
溶媒投与群では著しい腫瘍増殖が認め

られ、実験終了時 (Day 29) には 2041.96 ± 546.87 mm³ のサイズにまで達した。一方、各薬剤投与群では抗腫瘍性効果が認められ、実験終了時 (Day 29) にはゲムシタピン投与群の腫瘍サイズは 1140.43 ± 314.38 mm³、TS-1 投与群の腫瘍サイズは 1084.60 ± 362.61 mm³、アルクチゲニン投与群の腫瘍サイズは 997.88 ± 367.60 mm³、アルクチゲニン/ゲムシタピン投与群の腫瘍サイズは 905.36 ± 279.32 mm³、アルクチゲニン/TS-1 投与群の腫瘍サイズは 868.26 ± 225.40 mm³ 程度であった。

腫瘍サイズの変化を 6 群間で比較したところ、Day 15 以降で溶媒投与群に対して各薬剤投与群で有意な腫瘍増殖の抑制が認められた。

しかし、各薬剤投与群間の比較では、有意な差が認められなかった。

MIA PaCa 細胞での結果を図示する。



同様の検討を CAPAN-1 細胞を用いて行った。

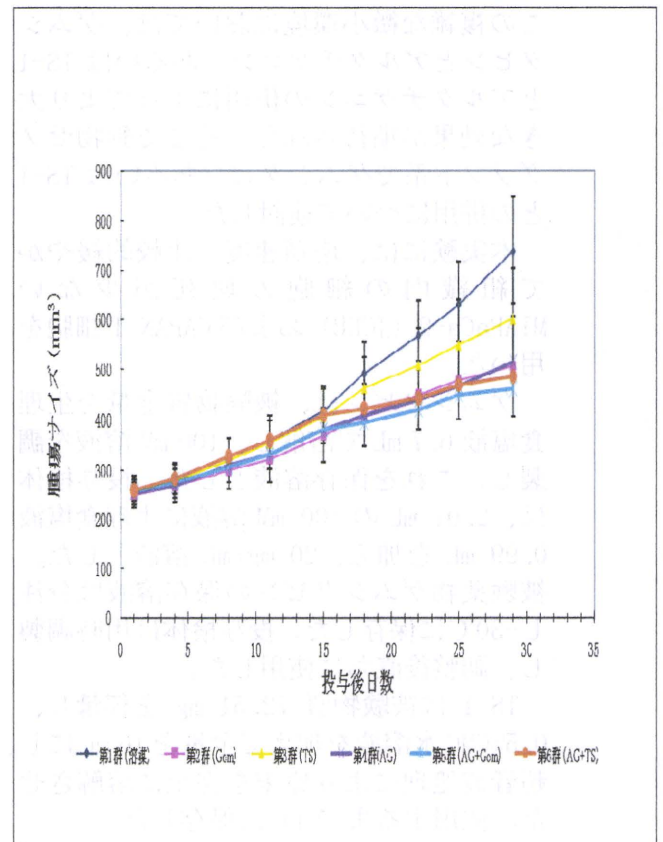
CAPAN-1 細胞は、ヌードマウスに細胞移植前に細胞培養フラスコ (培養面積 225 cm²) あたり 4.8 x 10⁶ 個の細胞を培養した。移植時、総細胞 5.60 x 10⁸ 個回収され、そのうち生細胞は 5.55 x 10⁸ 個で生存率は 99.1%であった。

群分けは移植日より 33 日目に行い、同日投与を開始した。

前の実験と同様に、一般症状観察で実験期間中、動物に特に異常は認められなかった。また、体重に関しても実験期間中、特に異常は認められなかった。

腫瘍サイズに関しては、各群とも Day 15 までは緩やかな腫瘍増殖を示し、それらの腫瘍サイズに大きな違いは見られなかった。

Day 15 以降、溶媒投与群では著しい腫瘍増殖が認められ、実験終了時 (Day 29) には 739.66 ± 113.33 mm³ のサイズにまで達した。一方、各薬剤投与群では抗腫瘍性効果が認められ、実験終了時 (Day 29) にはゲムシタビン投与群の腫瘍サイズは 506.96 ± 106.77 mm³、TS-1 投与群の腫瘍サイズは 602.90 ± 107.16 mm³、アルクチゲニン投与群の腫瘍サイズは 515.32 ± 111.46 mm³、アルクチゲニン/ゲムシタビン投与群の腫瘍サイズは 461.05 ± 69.87 mm³、アルクチゲニン/TS-1 投与群の腫瘍サイズは 486.43 ± 131.63 mm³ 程度であった。



各群の腫瘍サイズの変化。平均値 ± 標準偏差 (n=10) で示す。Day 1: 投与開始日。

腫瘍サイズの変化を 6 群間で比較したところ、TS-1 は Day 29 で、その他の薬剤は Day 18~Day 22 以降で溶媒投与群に対して有意な腫瘍増殖の抑制が認められた。

各薬剤単独投与群間の比較では、TS-1 よりゲムシタビンおよびアルクチゲニンの方が効果は大きく、ゲムシタビンおよびアルクチゲニン間では差はなかった。

薬剤併用群に関しては、アルクチゲニン/TS-1 併用は TS-1 単独に対して有意な併用治療効果が認められた。

急性及び亜急性毒性試験

アルクチゲニンおよびゲムシタビン併用療法の臨床試験に先立ち、アルクチゲニンの 2 週間連続経口投与およびゲムシタビン 2 週間における 1 回/週腹腔内投与ならびに両薬併用時の急性毒性試験を一般症状観察、体重測定、毒性評価パラメー

ターの測定ならびに病理組織学的検査を指標に実施した。

アルクチゲニン含有エキス 87.8 mg (アルクチゲニン 10 mg 当量) を秤量し、1 mL の 1% CMC で溶解後、超純水で総量 2 mL とし、500 · g/0.1 mL を調製した。被験薬物アルクチゲニン含有エキスの投与検体は用時調製し、調整後直ちに使用した。

ジェムザール注射用 200 mg 全量を生理食塩液 6.7 mL で溶解し、100 mM 溶液を調製し、これを保存溶液とした。保存溶液は分注し-30°C に保存した。投与の際に、2.01 mL の 100 mM 溶液に生理食塩液 0.99 mL を加えて 20 mg/mL 溶液の投与薬液とした。投与薬液は用時調製し、調整後直ちに使用した。

動物は、Cr1j:CD1 ICR マウスを用いた。6 週齢で実験施設に搬入し、一週間の馴化のの地試験を行った。

アルクチゲニン含有エキスは 2 週間経口投与した。また、ゲムシタピンは 1 週間に 1 回腹腔内投与した。実験期間中、一般症状観察及び体重測定を行った。投与開始日および投与開始後 2 週目に血液を採取した。また、採血後、剖検し必要な器官・組織を摘出した。

外部業者に委託して血液生化学的検査及び組織切片作製を行った

マウス一般症状観察:1 週間のうち 5 日間観察した。

体重測定:投与開始日、投与開始後 1 週目および 2 週目に測定した。血液学的検査:投与直前(ゼロポイント群)および投与開始後 2 週目に採血し、赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、白血球数(WBC)、血小板数(PLT)をセルタック α (日本光電工業株式会社) で測定した。

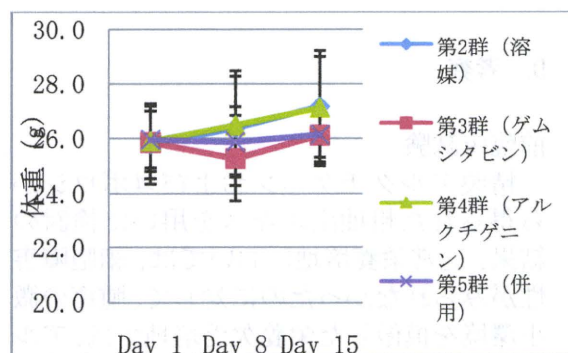
血液生化学的検査:投与直前および投与開始後 2 週目に採血し、血漿中の総蛋白、アルブミン、グロブリン、A/G 比、グルコース、総コレステロール、トリグリセリド、尿素窒素、クレアチニン、AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、ナトリウム、カリウム、クロールを測定した(財団法人食品農医薬品安全性評価センターに委託)。

器官・組織重量測定:投与直前(ゼロポイント群)および投与開始後 2 週目の採血後、全例の心臓、肺、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓(左右)の重量を測定した。

病理解剖学的検査:投与直前(ゼロポイント群)および投与開始後 2 週目の採血後、全例の胸腹腔内を肉眼観察し、代表例 1 匹/1 群及び異常の認められた個体の心臓、肺、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、骨髄(大腿骨)、食道、胃・十二指腸、空腸、回腸、結腸、直腸を採取し固定した。ヘマトキシリン・エオシン(HE)染色、TUNEL 染色、および未染色標本を作製した(株式会社ジェノスタッフに委託)。

病理組織学的検査(所見):胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、骨髄、巨核細胞数

体重変化



併用によりゲムシタピンの体重変化に対する増強は見られなかった。

一般症状、臨床検査いずれにおいても、ゲムシタピンの影響を増強することはなかった。

臨床試験のためのプロトコール研究

1. 現在までの前臨床試験は膵臓がん
に特化したものであるが、将来の事を考
えれば膵臓がん以外への応用も考え他の
細胞株、他の動物モデルでの抗腫瘍性の
検討を追加するのが望ましい。また、ヒ
トでの薬物動態と同じように抗腫瘍性を
示す投与量での動物の薬物動態を検討す
る必要がある。動物での薬物動態試験に
は血中濃度測定のため、感度を改良する
必要があり LC-UV の検出系を LC-MAS に変
更中である。
2. POC のためのバイオマーカーを考え
る必要があるが、メタボローム、PET、
Diffusion-weighted MRI 等を検討する
3. Phase I 試験は、単に
Pharmacokinetics に止まらず単剤での抗
腫瘍効果も End-point とするのがよい。
これがないと、牛蒡子の適応症がゲムシ
タピンあるいは TS-1 との併用だけで認め
られると将来の展開が苦しくなる。出来
るだけ早い時期に PMDA との相談をする。
4. いずれにしる大きな困難があるとは
思えないのでエキスとしての臨床試験の
デザインをする。

D. 考察

前臨床試験

精製アルクチゲニンおよびゴボウシから得られた粗抽出エキスをを用いた検討の結果、通常栄養培地においては、細胞障害性がみられなかったのに対して、腫瘍の微小環境を模倣した栄養欠乏培地では、アルクチゲニンの含量に従った抗腫瘍活性がみられた。また、ゴボウシの粗抽出物は、精製アルクチゲニンと同等の抗腫瘍活性を持つことが *in vitro* および *in vivo* の研究結果から明らかになった。栄養飢餓状態に選択的なアルクチゲニンの細胞障害性は、遺伝的背景の異なる膵臓がん細胞株

において広く見られたことから、特異な遺伝子系に働くのではなく、栄養状態など、微小環境に依存した変化によって細胞内で起こる代謝系などに作用していることが示唆された。

現在の前臨床試験での弱点は、ヒトでの薬物動態解析に関しては初歩的とはいえ十分に期待の持てる結果が出ているが、これに相当する動物モデルでの薬物動態試験が遅れていることである。至適投与量を算出する上では薬物動態が最も信頼性の高いデータになると思われるのでこの部分の補強が急がれる。

アルクチゲニンとゲムシタピンさらに TS-1 との併用効果を動物モデルにおいて検討したところ、併用によってより大きな抗腫瘍性を発揮することが明らかになった。しかしながら、ゲムシタピンとアルクチゲニンが実際に異なる環境で作用しているのかについては、本研究の中で明らかにできなかったため、今後動物モデルを用いて実証していく必要があると考えられる。

21 年度の研究で二つのモデルの動物実験の結果、移植モデルよりも実際のすい臓がんの病態に近いことが報告されている。遺伝的すい臓がん発症モデルにおいて、実験個体数が少ないものの病態の進展が明らかに抑えられていることや延命効果が顕著であることは、アルクチゲニンの潜在的な可能性を示していると思われる。今回の牛蒡子エキスの臨床導入に限らず、栄養飢餓体制制御薬の作用機序の解明と、臨床でより広く使われるようにするためには、モデルの改良、開発にも取り組む、よりわかりやすい POC のためのモデルを作る必要がある。

アルクチゲニンは、従来の抗がん剤とは、異なる作用機序によって抗腫瘍効果を示すことから、従来の抗がん剤では、効果の薄かったがんに対して有効な治療薬となる可能性があると考えられた。

急性及び亜急性毒性試験に関しては特に取り立てて大きな毒性は見られなかった。また、ゲムシタピンとの併用によっても、ゲムシタピンの毒性を大きく増強

するような反応は見られなかった。臨床試験を行う上で毒性の問題は慎重に検討される必要がある。

E. 結論

臨床試験のための検討の結果は今後の方針でもある、再度記述をする。1. 現在までの前臨床試験は膵臓がんの特化したものであるが、将来の事を考えれば膵臓がん以外への応用も考え他の細胞株、他の動物モデルでの抗腫瘍性の検討を追加するのが望ましい。2. POC のためのバイオマーカーを考える必要があるが、メタボローム、PET、Diffusion-weighted MRI 等も検討する。3. Phase I 試験は、単に Pharmacokinetics に止まらず単剤での抗腫瘍効果も End-point とするのがよい。これがないと、牛蒡子の適応症がゲムシタビンあるいはTS-1との併用だけで認められると将来の展開が苦しくなる。出来るだけ早い時期にPMDAとの相談をする。4. いずれにしろ大きな困難があるとは思えないのでエキスとしての臨床試

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

研究の刊行に関する一覧表に記載。

H. 知的財産権の出願・登録状況

2. 江角浩安 アルクチゲニン高含有ゴボウシエキス及びその製造方法
出願番号[2010-505497]

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）

（総括）研究報告書

臨床試験の計画及び統括

研究分担者 大津 敦

独立行政法人国立がん研究センター東病院 臨床開発センター長

研究要旨

既存の抗がん剤は、酸素や栄養供給が不足している腫瘍組織では有効性が極端に低くなるが、この微小環境下で最大の効果を得られる、正常組織に低毒性の抗腫瘍薬をスクリーニングしキガマイシン、アルクチゲニンなどを見いだした。本研究では、局方に登録されたゴボウシ抽出エキスにアルクチゲニンが多く含まれる事に注目し、アルクチゲニンと同じ効果を得られるかを検討した。臨床ですい臓がんに対する標準治療薬として用いられているゲムシタビンあるいはTS-1との併用効果についても検討し、早期の臨床導入をめざし、前臨床試験を実施した。その結果、多くの細胞腫で抗腫瘍性を認めた。ゲムシタビンあるいはTS-1との併用では明らかに抗腫瘍効果が増強され、また、単独での毒性及びゲムシタビンとの併用による毒性は2週連続投与で見ると特記するほどのものはなかった。早期の臨床導入をめざし、前臨床試験を追加実施すると共に臨床試験のためのプロトコールの検討をした。

A. 研究目的

既存の抗がん剤は、酸素供給や栄養供給が不足している腫瘍組織では有効性が極端に低くなることを報告してきた。そこで我々は、そういった腫瘍組織の微小環境下で細胞障害性を最大に発揮する物質の探索を目的として、がん組織に特異的なエネルギー代謝系を標的とした、正常組織に対して相対的に低毒性の抗腫瘍薬をスクリーニングしてきた。

天然物の中からこれまでにキガマイシン、アルクチゲニンなどを見いだしてきたが、本研究では、既に局方薬として登録されているゴボウシにアルクチゲニンが多く含まれる事に注目し、ゴボウシ抽出エキスによって、精製アルクチゲニンと同じ効果を得られる事を確認し、さらに臨床ですい臓がんに対する標準治療薬として用いられているゲムシタビン、TS-1との併用効果についても検討し、早期の臨床導入を目的とした。

B. 研究方法

江角分担研究者の項目で述べられてい

る通り、臨床導入のための前臨床試験を行いこれを班員全体で討議し、臨床導入のための道筋に関する討議と共にプロトコール検討を行った。

（倫理面への配慮）

この研究で行われる、全ての動物実験は国立がんセンターにおける動物実験倫理審査委員会で討議され承認されている。また、臨床試験に関しては本年度は行われていないが今後プロトコールを作成し、国立がん研究センター倫理審査委員会において審査を受け、臨床試験登録をした後に行う予定。

C. 研究結果

前臨床試験の結果は江角分担研究者の報告書に書かれているとおりである。毒性の検討の追加をする事にした。また、前臨床で用いられている細胞が全てヒトの膵臓がんであるため、他の腫瘍系、大腸がん、胃がん食道がんなどにも拡げて検討する事にした。

ヒトでの初歩的な薬物動態検討を行い、血中には十分な薬剤濃度が得られること

が分かったが、代謝も含めてさらに詳細に検討することにした。また、薬剤の至適投与量設定のためにもヒトおよび動物での薬物動態を測定法の感度改善を含めて行い、プロトコールに反映することにした。

フェーズ 1 の設定を、当初 Pharmacokinetics を中心に行う案も出たが、単剤で抗腫瘍効果も検討する事、その上でゲムシタビンあるいはTS-1との併用による抗腫瘍効果を検討すべきとの検討をした。しかし、いずれにしろ早い段階で医薬品機構との接触をして臨床試験のデザインを決めるべきとの結論をした。Phase I/II プロトコールのドラフトが出来た。

D. 考察

どれだけ早く患者の元にこの成果を届けるのかと考えた時、早い段階で抗腫瘍効果を示す事によって、以降の大規模な臨床試験を企業ベースで出来るようにすべきであろう。何処の段階でどの様に企業に手渡すのかがポイントである。

E. 結論

出来るだけ早く臨床導入するために、牛蒡子のエキスとしての臨床試験をする。その為の医薬品機構との接触を始め、臨床試験プロトコールを確定し倫理審査に提出する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

研究の刊行に関する一覧表に記載。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）

（総括）研究報告書

臨床試験の計画、解析・臨床試験実施支援

研究分担者 佐藤 暁洋

独立行政法人国立がん研究センター東病院 臨床開発センター 臨床試験支援室

研究要旨

既存の抗がん剤は、酸素や栄養供給が不足している腫瘍組織では有効性が極端に低くなるが、この微小環境下で最大の効果を得られる、正常組織に低毒性の抗腫瘍薬をスクリーニングしキガマイシン、アルクチゲニンなどを見いだした。本研究では、局方に登録されたゴボウシ抽出エキスにアルクチゲニンが多く含まれる事に注目し、アルクチゲニンと同じ効果を得られるかを検討した。臨床ですい臓がんに対する標準治療薬として用いられているゲムシタビンとの併用効果についても検討し、早期の臨床導入をめざし、前臨床試験を実施した。その結果、多くの細胞腫で抗腫瘍性を認めた。また、単独での毒性及びゲムシタビンとの併用による毒性は2週で見る限り特記するほどのものはなかった。早期の臨床導入をめざし、前臨床試験を追加実施すると共に臨床試験のためのプロトコールの検討をした。

A. 研究目的

既存の抗がん剤は、酸素供給や栄養供給が不足している腫瘍組織では有効性が極端に低くなることを報告してきた。そこで我々は、そういった腫瘍組織の微小環境下で細胞障害性を最大に発揮する物質の探索を目的として、がん組織に特異的なエネルギー代謝系を標的とした、正常組織に対して相対的に低毒性の抗腫瘍薬をスクリーニングしてきた。

天然物の中からこれまでにキガマイシン、アルクチゲニンなどを見いだしてきたが、本研究では、既に局方薬として登録されているゴボウシにアルクチゲニンが多く含まれる事に注目し、ゴボウシ抽出エキスによって、精製アルクチゲニンと同じ効果を得られる事を確認し、さらに臨床ですい臓がんに対する標準治療薬として用いられているゲムシタビン、TS-1 との併用効果についても検討し、早期の臨床導入を目的とした。

B. 研究方法

江角分担研究者の項目で述べられている通り、臨床導入のための前臨床試験を

行いこれを班員全体で討議し、臨床導入のための道筋に関する討議と共にプロトコール検討を行った。

（倫理面への配慮）

この研究で行われる、全ての動物実験は国立がんセンターにおける動物実験倫理審査委員会で討議され承認されている。また、臨床試験に関しては本年度は行われていないが今後プロトコールを作成し、国立がん研究センター倫理審査委員会において審査を受け、臨床試験登録をした後に行う予定。

C. 研究結果

前臨床試験の結果は江角分担研究者の報告書に書かれているとおりである。毒性の検討の追加をする事にした。また、前臨床で用いられている細胞が全てヒトの膵臓がんであるため、他の腫瘍系、大腸がん、胃がん食道がんなどにも拡げて検討する事にした。

ヒトでの初歩的な薬物動態検討を行い、血中には十分な薬剤濃度が得られることが分かったが、代謝も含めてさらに詳細