

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 8 月 21 日(21.08.2014)



(10) 国際公開番号

WO 2014/125977 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 8/64 (2006.01) A61P 1/02 (2006.01)
A61K 8/67 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61K 31/375 (2006.01) A61Q 11/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/052676
- (22) 国際出願日: 2014 年 2 月 5 日(05.02.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-026574 2013 年 2 月 14 日(14.02.2013) JP
- (71) 出願人: ライオン株式会社(LION CORPORATION)
[JP/JP]; 〒1308644 東京都墨田区本所一丁目 3 番 7 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 阿部 眞里(Abe Mari); 〒1308644 東京都墨田区本所一丁目 3 番 7 号 ライオン株式会社内 Tokyo (JP). 近澤 貴士(Chikazawa Takashi); 〒1308644 東京都墨田区本所一丁目 3 番 7 号 ライオン株式会社内 Tokyo (JP). 鈴木 苗穂(Suzuki Naho); 〒1308644 東京都墨田区本所一丁目 3 番 7 号 ライオン株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 小島 隆司, 外(KOJIMA Takashi et al.); 〒1040061 東京都中央区銀座二丁目 1 6 番 1 2 号 銀座大塚ビル 2 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: ORAL COMPOSITION

(54) 発明の名称: 口腔用組成物

(57) Abstract: Provided is an oral composition which has an excellent bactericidal effect against oral bacteria, in particular, porphyromonas gingivalis, a periodontal disease-causing bacteria, and has an excellent cytotoxicity inhibitory effect in the oral cavity, which is effective in the prevention and treatment of periodontal disease, and which contains (A) human defensin and (B) ascorbic acid ester or a salt thereof.

(57) 要約: 口腔内細菌、特に歯周病原菌であるポルフィロモナス ジンジバリスに対する殺菌効果と口腔内の細胞傷害抑制効果とが優れ、歯周病の予防又は治療に有効な、(A) ヒトディフェンシンと (B) アスコルビン酸エステル又はその塩とを含有してなる口腔用組成物を提供する。



WO 2014/125977 A1

明 細 書

発明の名称： 口腔用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、口腔内細菌、特に歯周病原菌であるポルフィロモナス ジンジバリスに対する殺菌効果と口腔内の細胞傷害抑制効果とが優れ、歯周病の予防、治療に有効な、ヒトディフェンシン含有の口腔用組成物に関する。

背景技術

[0002] 歯周病は、ポルフィロモナス ジンジバリス (*P. gingivalis*) 等の嫌気性グラム陰性菌を主とした細菌による感染症であり、菌が産生する外毒素（ロイコトキシン等）や内毒素（リポ多糖等）によって炎症が誘発され、組織が損傷する。一方、生体では、好中球やリンパ球等が歯周ポケットや歯肉組織へ浸潤し、細菌を貪食するとともに、特異的な抗体を作ってこれら異物を排除する免疫応答が起こるものであるが、近年、貪食時に過剰に発生した活性酸素が、生体組織を更に損傷することが指摘されている。例えば、歯肉を構成する線維芽細胞が活性酸素によって傷害を受けると、コラーゲン繊維の破壊や細胞増殖能低下を招くため、歯肉が退縮して歯周病が進行する。

従って、歯周炎等の歯周病の予防、治療には、口腔内の歯周病原菌の殺菌と共に、上記のような口腔内の細胞傷害を抑制することが有効であると考えられており、両効果を兼ね備えた口腔用組成物を与える技術の開発が望まれる。

[0003] 口腔内の歯周病原性細菌の殺菌に関しては、宿主由来のペプチドであるヒトディフェンシンが、幅広い口腔内病原性細菌に対する抗菌作用を有し、人体にも安全であることが知られている。特許文献1（特開2001-288105号公報）には、ヒト β ディフェンシンが歯周炎原因菌のアクチノバシルス アクチノミセテムコミタンス (*Actinobacillus actinomyces comitans*) に対して強い抗菌活性があり、

ポルフィロモナス ジンジバリス (P o r p h y r o m o n a s g i n g i v a l i s) 等の歯周炎原因菌にも抗菌活性があることが開示され、ヒト β ディフェンシン含有歯磨剤が提案されている。また、特許文献2 (特開2009-155214号公報) には、ヒトディフェンシンとデキストラナーゼとを併用することで、口腔内バイオフィルム抗菌効果が向上した口腔用組成物が提案されている。

しかしながら、ヒトディフェンシンは、歯周病原性細菌に対する殺菌効果が十分とはいえず、殺菌力の向上が課題となっていた。

[0004] 一方、口腔内の細胞傷害抑制に関しては、アスコルビン酸リン酸エステル等のアスコルビン酸エステル又はその塩が、生体内に産生された過剰な活性酸素を消去して生体組織を酸化ストレス傷害から保護すると共に炎症を抑制し、口腔内細胞の傷害抑制効果を有することが知られているが、その細胞傷害抑制効果は未だ改善の余地があるものであった。なお、アスコルビン酸エステル又はその塩は、歯周病原菌への殺菌効果を有さない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2001-288105号公報

特許文献2：特開2009-155214号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、上記事情に鑑みなされたもので、口腔内細菌、特に歯周病原菌に対する殺菌効果及び口腔内の細胞傷害抑制効果に優れ、歯周病の予防、治療に有効な口腔用組成物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

[0007] 本発明者らは、上記目的を達成するため鋭意検討を行った結果、(A) ヒトディフェンシンと (B) アスコルビン酸エステル又はその塩とを併用すると、口腔内細菌、特に歯周病原菌であるポルフィロモナス ジンジバリス

(以下、P. g. 菌と略記する。) に対する殺菌効果と口腔内細胞傷害抑制効果とが、格段に向上することを見出した。

[0008] 即ち、宿主由来のペプチドであるヒトディフェンシンは、歯周病原菌への抗菌活性を有し、人体に安全な成分として公知であるが、本発明者らがその殺菌効果について検討したところ、特に歯周病原菌のP. g. 菌に対して十分な殺菌効果がないという課題があることがわかった。そこで、この課題を解決するため更に検討を進めた結果、(A) ヒトディフェンシンと(B) アスコルビン酸エステル又はその塩、特にアスコルビン酸リン酸エステル、アスコルビン酸硫酸エステル又はその塩とを組み合わせると、意外にも、(A)、(B) 成分が特異的かつ相乗的に作用し、ヒトディフェンシン由来の口腔内細菌殺菌効果、とりわけ上記歯周病原菌に対する殺菌効果が増強すると共に、アスコルビン酸エステル又はその塩に由来する酸化ストレス抑制による細胞傷害抑制効果が増強し、優れた口腔内細菌殺菌効果及び細胞傷害抑制効果を奏することを見出した。更に、口腔用組成物に(A)、(B) 成分の併用系を配合することによって、高い口腔内細菌殺菌効果及び細胞傷害抑制効果を奏し、歯周病の予防、治療に有効な製剤を得ることができた。

[0009] この場合、後述の比較例に示すように、ヒトディフェンシンの口腔内細菌殺菌効果は十分でなく、細胞傷害抑制効果は認められず、また、アスコルビン酸エステル又はその塩の細胞傷害抑制効果は十分ではなく、口腔内細菌殺菌効果は認められないにもかかわらず、実施例に示すように、本発明においては、(A)、(B) 成分の併用系によって、(A) 又は(B) 成分の単独配合系の相加効果を超えて口腔内細菌殺菌効果及び細胞傷害抑制効果を増強し得たものである。また、本発明の上記作用効果は、(A)、(B) 成分の併用系に特異的なものであって、抗菌作用を有する唾液タンパク質のヒスタチンを(A) 成分の代わりに用いても、あるいはアスコルビン酸ナトリウム等のアスコルビン酸塩を(B) 成分の代わりに用いてもなし得ない、格別顕著なものである。

[0010] 従って、本発明は、下記の口腔用組成物を提供する。

〔１〕

（Ａ）ヒトディフェンシンと、（Ｂ）アスコルビン酸エステル又はその塩とを含有してなることを特徴とする口腔用組成物。

〔２〕

（Ａ）成分が、ヒトディフェンシン β -２又はヒトディフェンシン β -３である〔１〕に記載の口腔用組成物。

〔３〕

（Ｂ）成分が、アスコルビン酸リン酸エステル及びその塩、アスコルビン酸硫酸エステル及びその塩から選ばれる１種以上である〔１〕又は〔２〕に記載の口腔用組成物。

〔４〕

（Ｂ）成分が、アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム及び／又はアスコルビン酸リン酸エステルナトリウムである〔３〕に記載の口腔用組成物。

〔５〕

（Ａ）成分を０．０００００５～０．０００５質量％、（Ｂ）成分を０．１～２質量％含有する〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の口腔用組成物。

〔６〕

（Ａ）成分に対して（Ｂ）成分が質量比で２００～４００，０００倍量である〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の口腔用組成物。

〔７〕

歯磨剤又は洗口剤である〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の口腔用組成物。

〔８〕

歯周病予防又は治療用である〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の口腔用組成物。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、口腔内細菌、特に歯周病原菌である *P. g.* 菌に対す

る殺菌効果と口腔内の細胞傷害抑制効果とが優れ、また人体にも安全であり、歯周病の予防、治療に有効なヒトディフェンシン含有の口腔用組成物を提供できる。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明につき更に詳述する。本発明の口腔用組成物は、(A) ヒトディフェンシンと (B) アスコルビン酸エステル又はその塩とを併用することを特徴とするもので、かかる併用系により特異的かつ相乗的に口腔内細菌殺菌効果及び細胞傷害抑制効果が向上する。

[0013] (A) ヒトディフェンシンには、ヒトディフェンシン α 、ヒトディフェンシン β としてヒトディフェンシン $\beta-1$ 、ヒトディフェンシン $\beta-2$ 、ヒトディフェンシン $\beta-3$ の種類があり、これらから選ばれる1種又は2種以上を使用できるが、特に歯周病原菌の殺菌効果の面からヒトディフェンシン $\beta-2$ 、ヒトディフェンシン $\beta-3$ が好ましい。

ヒトディフェンシンは市販品を使用することができ、例えばペプチド研究所社製のヒトディフェンシン $\beta-2$ 、Anygen社製のヒトディフェンシン $\beta-3$ が挙げられる。

[0014] (A) ヒトディフェンシンの配合量は、組成物全体の0.000005～0.0005%（質量%、以下同様。）が好ましく、特に0.00005～0.0005%がより好ましい。配合量が多くなるにつれて口腔内細菌殺菌効果、細胞傷害抑制効果が向上し、0.000005%以上配合することが効果発現には好適である。また、配合量が多すぎると、最早効果向上が望めないだけでなく、異味が発現して使用感が低下する場合があります、0.0005%以下であることが良好な使用感確保には好適である。

[0015] (B) 成分のアスコルビン酸エステルは、アスコルビン酸の2, 3, 5, 6位のいずれかの水酸基の1つ又は2つ以上がリン酸、ポリリン酸、硫酸、脂肪酸、又はその他薬学上許容される化合物のエステルとなったものである。

アスコルビン酸エステル又はその塩としては、特にアスコルビン酸リン酸

エステル又はその塩、アスコルビン酸硫酸エステル又はその塩が好ましい。アスコルビン酸リン酸エステル、アスコルビン酸硫酸エステルは、アスコルビン酸の2, 3, 5, 6位のいずれかの水酸基の1つ又は2つ以上がリン酸、ポリリン酸等のリン酸化合物又は硫酸のエステルとなったものであり、具体的には、アスコルビン酸-2-リン酸エステル、アスコルビン酸-3-リン酸エステル、アスコルビン酸-6-リン酸エステル、アスコルビン酸-2-ポリリン酸エステル、アスコルビン酸-2-硫酸エステルが挙げられる。その塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩が挙げられる。(B)成分としては、これらから選ばれる1種又は2種以上を使用できるが、特に口腔用として用いるものであり、歯肉炎予防効果、とりわけ細胞傷害抑制効果の点から、アスコルビン酸リン酸エステルのマグネシウム塩、ナトリウム塩が好適に用いられる。

[0016] (B)アスコルビン酸エステル又はその塩の配合量は、組成物全体の0.1~2%が好ましく、より好ましくは0.2~1%である。配合量が多くなるにつれて口腔内細菌殺菌効果、細胞傷害抑制効果が向上し、0.1%以上配合することが口腔内細菌殺菌効果、細胞傷害抑制効果の向上には好適である。また、2%以下であることが、口腔内細菌殺菌効果向上、良好な使用感確保には好適である。多く配合し過ぎると、口腔内細菌殺菌効果が低下する場合がある。また、異味が発現して使用感が低下する場合がある。

[0017] 本発明においては、(A)ヒトディフェンシンに対して(B)アスコルビン酸エステル又はその塩が質量比で20倍量以上、特に200~400, 000倍量であることが好ましく、より好ましくは400~200, 000倍量、さらに好ましくは1, 000~100, 000倍量、とりわけ好ましくは1, 000~10, 000倍量の範囲であり、このような割合で配合すると、本発明効果がより向上する。

[0018] 本発明の口腔用組成物は、練歯磨、液体歯磨、液状歯磨、潤製歯磨等の歯磨剤、洗口剤などの様々な剤型に常法を採用して製造することが可能である。

が、特に歯磨剤に好適である。この場合、組成物の目的、剤型等に応じて、上記成分以外にも適宜な公知成分を本発明の効果を妨げない範囲で配合できる。例えば歯磨剤では、研磨剤、粘稠剤、粘結剤、界面活性剤、更に必要により香料、甘味料、着色剤、防腐剤、有効成分などが配合される。

[0019] 研磨剤としては、シリカゲル、沈降シリカ、アルミノシリケート、ジルコノシリケート等のシリカ系研磨剤、第2リン酸カルシウム2水和物及び無水和物、第3リン酸カルシウム、第4リン酸カルシウム、ピロリン酸カルシウム、炭酸カルシウム、水酸化アルミニウム、アルミナ、炭酸マグネシウム、第3リン酸マグネシウム、ゼオライト、ハイドロキシアパタイト、合成樹脂系研磨剤などが挙げられる。研磨剤の配合量は、剤型により調整され、練歯磨では2～40%、特に10～30%が好ましく、液体歯磨では0%である。

[0020] 粘稠剤としては、ソルビット、キシリット、マルチット、ラクチット等の糖アルコール、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等の多価アルコールが挙げられ、配合量は通常、5～50%、特に20～45%が好ましい。

[0021] 粘結剤としては、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース等のセルロース誘導体、キサンタンガム、アラビアガム等のガム類、カラゲナン、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸ナトリウム等の有機粘結剤、ゲル化性シリカ、ゲル化性アルミニウムシリカ、ビーガム、ラボナイト等の無機粘結剤が挙げられる。配合量は、通常、練歯磨では0.1～5%、液体歯磨や洗口剤では0～5%である。

[0022] 界面活性剤としては、アニオン性界面活性剤、ノニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、両性界面活性剤を配合できる。

アニオン性界面活性剤としては、ラウリル硫酸ナトリウム等のアルキル硫酸塩、N-ラウロイルサルコシンナトリウム、N-ミリストイルサルコシンナトリウム等のN-アシルサルコシン酸塩、N-パルミトイルグルタミン酸ナトリウム等のN-アシルグルタミン酸塩、N-メチル-N-アシルタウリ

ンナトリウム、N-メチル-N-アシルアラニンナトリウム、 α -オレフィンスルホン酸ナトリウムなどが挙げられる。

ノニオン性界面活性剤としては、ショ糖脂肪酸エステル、マルトース脂肪酸エステル等の糖脂肪酸エステル、マルチトール脂肪酸エステル、ラクチトール脂肪酸エステル等の糖アルコール脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、モノラウリン酸ヘキサグリセリル、モノミリスチン酸ヘキサグリセリル、モノラウリン酸デカグリセリル、モノミリスチン酸デカグリセリル等のポリグリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油等のポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンラウリルエーテル等のポリオキシエチレン高級アルコールエーテル、ラウリン酸ジエタノールアミド等の脂肪酸アルカノールアミド、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン共重合体、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン脂肪酸エステルなどが挙げられる。

カチオン性界面活性剤としては、アルキルアンモニウム、アルキルベンジルアンモニウム塩など、両性界面活性剤としては、アルキルベタイン、脂肪酸アミドプロピルベタイン、アルキルイミダゾリニウムベタイン等のベタイン系などが挙げられる。

界面活性剤の配合量は、組成物全体の0.001~10%、特に0.1~5%が好ましい。

[0023] 香料としては、ペパーミント油、スペアミント油、アニス油、ユーカリ油、ウインターグリーン油、カシア油、クローブ油、タイム油、セージ油、レモン油、オレンジ油、ハッカ油、カルダモン油、コリアンダー油、マンダリン油、ライム油、ラベンダー油、ローズマリー油、ローレル油、カモミル油、キャラウェイ油、マジョラム油、ベイ油、レモングラス油、オリガナム油、パインニードル油、ネロリ油、ローズ油、ジャスミン油、グレープフルーツ油、スウィーティー油、柚油、イリスコンクリート、アブソリュートペパ

ーミント、アブソリュートローズ、オレンジフラワー等の天然香料、及び、これら天然香料の加工処理（前溜部カット、後溜部カット、分留、液液抽出、エッセンス化、粉末香料化等）した香料、及び、メントール、カルボン、アネトール、シネオール、サリチル酸メチル、シンナミックアルデヒド、オイゲノール、3-イソメントキシプロパン-1,2-ジオール、チモール、リナロール、リナリールアセテート、リモネン、メントン、メンチルアセテート、N-置換-パラメントン-3-カルボキサミド、ピネン、オクチルアルデヒド、シトラール、プレゴン、カルビールアセテート、アニスアルデヒド、エチルアセテート、エチルブチレート、アリルシクロヘキサプロピオネート、メチルアンスラニレート、エチルメチルフェニルグリシデート、バニリン、ウンデカラクトン、ヘキサナール、ブタノール、イソアミルアルコール、ヘキセノール、ジメチルサルファイド、シクロテン、フルフラール、トリメチルピラジン、エチルラクテート、エチルチオアセテート等の単品香料、更に、ストロベリーフレーバー、アップルフレーバー、バナナフレーバー、パイナップルフレーバー、グレープフレーバー、マンゴーフレーバー、バターフレーバー、ミルクフレーバー、フルーツミックスフレーバー、トロピカルフルーツフレーバー等の調合香料等、口腔用組成物に用いられる公知の香料素材を組み合わせて使用することができる。

また、配合量も特に限定されないが、上記の香料素材は、製剤組成中に0.000001～1%使用するのが好ましい。また、上記香料素材を使用した賦香用香料としては、製剤組成中に0.1～2%使用するのが好ましい。

[0024] 甘味料としては、サッカリンナトリウム、ステビオサイド、パラメトキシシンナミックアルデヒド、ペリラルチン等が挙げられる。着色剤としては、青色1号、黄色4号、二酸化チタン等が挙げられる。

防腐剤としては、パラオキシ安息香酸エステル、安息香酸ナトリウム等の安息香酸又はその塩などが挙げられる。

[0025] 有効成分としては、ヒトディフェンシン並びにアスコルビン酸エステル及びその塩以外のもの、例えばイソプロピルメチルフェノール等の非イオン性

殺菌剤、塩化セチルピリジニウム、塩酸クロルヘキシジン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム等のカチオン性殺菌剤、トラネキサム酸、イブシロンアミノカプロン酸、アラントイン、グリチルレチン酸、グリチルリチン酸等の抗炎症剤、デキストラナーゼ、ムタナーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ等の酵素、フッ化ナトリウム、モノフルオロリン酸ナトリウム等のフッ化物、正リン酸のカリウム塩、ナトリウム塩等の水溶性リン酸化合物、グルコン酸銅、銅クロロフィリンナトリウム等の銅化合物、塩化ナトリウム、硝酸カリウム、乳酸アルミニウム、塩化亜鉛、クエン酸亜鉛、塩化ストロンチウムなどの無機塩類、酢酸トコフェロール等のビタミン類、ゼオライト、アズレン、ジヒドロコレステロール、クロロフィル、トウキ軟エキス、タイム、オウゴン、チョウジ、ハマメリス等の植物抽出物、歯石防止剤、歯垢防止剤などが挙げられる。これら有効成分は、本発明の効果を妨げない範囲で有効量配合できる。

実施例

[0026] 以下、実施例及び比較例、処方例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に制限されるものではない。なお、下記の例において％は特に断らない限りいずれも質量％を示す。

[0027] [実施例、比較例]

表1に示す組成の試料溶液を常法により調製し、下記実験例に示す方法で細胞傷害抑制効果、口腔内細菌殺菌効果を評価した。結果を表に併記した。

[0028] 〈実験例1〉 細胞傷害抑制効果試験

市販の歯肉線維芽細胞G i n - 1 (D Sファーマバイオメディカル社製)を10%牛胎児血清(FBS)含有D u l l b e c c o ' s M o d i f i e d E a g l e M e d i u m (D-MEM)中で、37℃、5%CO₂の条件下で前培養した。5×10⁴c e l l s / m Lに調製したG i n - 1を48ウェルプレートに400μL播種し、さらに24時間培養した。培養液を除去後、表に示した試料溶液をそれぞれ400μL添加(10%FBS含有D-MEMで20倍希釈)して48時間、薬剤処置した。

処置終了後、1 mMの過酸化水素水溶液（活性酸素を想定）を60分間添加した。処置終了後、試料溶液を除去し、1 mMの過酸化水素を含む溶液（10% FBS含有D-MEM）を400 μ L添加し、60分間処置した。溶液を除去後、細胞活性試薬（Calcein AM；インビトロジェン社製）を200 μ L添加し、37℃、5% CO₂条件下で30分間インキュベートした。その後、プレートリーダー（Fluoroskan Ascent；Lab systems社製）を用いて、Ex/Em=485 nm/538 nmの条件下で蛍光強度を測定した。

下記計算式（1）から算出した結果を細胞傷害抑制率とした。細胞傷害抑制試験はn=10で実施した。平均値を算出し、下記の評点基準で細胞傷害抑制効果を評価した。

細胞傷害抑制率（%）＝（試料溶液処置後に過酸化水素処置した場合の蛍光強度）／（試料溶液処置後に過酸化水素無処置の場合の蛍光強度）×100 …（1）

[0029] 細胞傷害抑制効果の評点基準；

- ◎：細胞傷害抑制率が90%以上
- ：細胞傷害抑制率が70%以上90%未満
- △：細胞傷害抑制率が50%以上70%未満
- ×：細胞傷害抑制率が50%未満

[0030] 〈実験例2〉 口腔内細菌殺菌効果試験

ヘミン（和光純薬工業（株）製、500 μ g/mL）、メナジオン（和光純薬工業（株）製、100 μ g/mL）を添加したトッド・ヒューイット・ブロス（日本ベクトンディッキンソン社製）で前培養したポルフィロモナス ジンジバリス ATCC 33277株を生理食塩水で1×10⁹個/mLになるように菌の浮遊液を調製した。当菌液と表に示した試料溶液を1：1（容量比）で混合し、3分間静置した。その後、生理食塩水で10倍ずつ4段階希釈を行い、スパイラルプレーターにて血液寒天平板に塗抹した。対照として薬剤の代わりに生理食塩水と菌液を1：1（容量比）で混合したものを

用いた。

血液平板を 37℃、嫌気条件（95 vol %窒素、5 vol %二酸化炭素）下で 5 日間培養し、形成したコロニー数を計測した。この口腔内細菌殺菌試験は $n = 5$ で実施した。平均値を算出し、対照溶液のコロニー数に対する試料溶液のコロニー数を生菌率として求め、下記基準に基づき口腔内細菌殺菌効果を評価した。

[0031] 口腔内細菌殺菌効果の評価基準；

- ◎：対照と比較して生菌率が 10%未満
- ：対照と比較して生菌率が 10%～40%未満
- △：対照と比較して生菌率が 40%～80%未満
- ×：対照と比較して生菌率が 80%以上

[0032] 使用原料の詳細を下記に示す。

(A) ヒトディフェンシン（ヒトディフェンシン β -2、ペプチド研究所社製）

(B) アスコルビン酸-2-リン酸エステルマグネシウム（和光純薬工業（株）製）

(B) アスコルビン酸-2-リン酸エステルナトリウム（和光純薬工業（株）製）

(B) アスコルビン酸-2-硫酸エステルナトリウム（和光純薬工業（株）製）

アスコルビン酸ナトリウム（和光純薬工業（株）製）

ヒスタチン 5（和光純薬工業（株）製）

[0033]

[表1]

		配合量(%)							結果	
		(A) ヒトディフェン シン	(B)			その他 成分	精製水	合計	細胞傷 害抑制 効果	口腔内 細菌殺 菌効果
			アスコルビン酸- 2-リン酸エステル マグネシウム	アスコルビン酸- 2-硫酸エステル ナトリウム	アスコルビン酸- 2-リン酸エステル ナトリウム					
比較 例	1	0.000005	-	-	-	-	バランス	100.0	×	△
	2	0.0005	-	-	-	-	バランス	100.0	×	△
	3	-	0.5	-	-	-	バランス	100.0	△	×
	4	-	0.5	-	-	0.02 (ヒスタチン5)	バランス	100.0	△	△
	5	0.0005	-	-	-	0.5 (アスコルビン 酸ナトリウム)	バランス	100.0	△	△
実 施 例	1	0.000005	0.5	-	-	-	バランス	100.0	○	○
	2	0.00001	0.5	-	-	-	バランス	100.0	○	○
	3	0.00005	0.5	-	-	-	バランス	100.0	◎	◎
	4	0.0001	0.5	-	-	-	バランス	100.0	◎	◎
	5	0.0001	-	0.5	-	-	バランス	100.0	○	◎
	6	0.0001	-	-	0.5	-	バランス	100.0	◎	◎
	7	0.0005	0.5	-	-	-	バランス	100.0	◎	◎
	8	0.0001	0.2	-	-	-	バランス	100.0	◎	◎
	9	0.0001	1.0	-	-	-	バランス	100.0	◎	◎
	10	0.0001	1.5	-	-	-	バランス	100.0	◎	○
	11	0.0001	2.0	-	-	-	バランス	100.0	◎	○

[0034] 以下、処方例を示す。下記例はいずれも優れた細胞傷害抑制効果及び口腔内細菌殺菌効果を有していた。

[0035] [処方例1] 練歯磨

(A) ヒトディフェンシンβ-2 (ペプチド研究所社製) 0.00001%

(B) アスコルビン酸-2-リン酸エステルマグネシウム

(和光純薬工業(株)製) 0.5

無水ケイ酸 20.0

ラウリル硫酸ナトリウム 1.0

プロピレングリコール 3.0

ソルビット液(100%品) 30.0

キシリタンガム 1.0

サッカリンナトリウム 0.1

香料 1.0

<u>精製水</u>	<u>バランス</u>
------------	-------------

合計	100.0%
----	--------

[0036] [処方例2] 液体歯磨

(A) ヒトディフェンシン β -3 (Anygen社製)	0.0005%
-------------------------------------	---------

(B) アスコルビン酸-2-リン酸エステルマグネシウム	
-----------------------------	--

(和光純薬工業(株)製)	0.5
--------------	-----

キシリトール	3.0
--------	-----

グリセリン (A1=100)	2.0
----------------	-----

ポリオキシエチレン (60) 硬化ヒマシ油	
-----------------------	--

(HCO-60)	0.5
----------	-----

クエン酸ナトリウム	0.3
-----------	-----

クエン酸	0.1
------	-----

安息香酸ナトリウム	0.3
-----------	-----

安息香酸メチル	0.1
---------	-----

香料	0.2
----	-----

サッカリンナトリウム	0.002
------------	-------

プロピレングリコール	3.0
------------	-----

ポリエチレングリコール	5.0
-------------	-----

<u>精製水</u>	<u>バランス</u>
------------	-------------

合計	100.0%
----	--------

[0037] [処方例3] 液体歯磨

(A) ヒトディフェンシン β -2 (ペプチド研究所社製)	0.0001%
--------------------------------------	---------

(B) アスコルビン酸-2-リン酸エステルマグネシウム	
-----------------------------	--

(和光純薬工業(株)製)	0.5
--------------	-----

キシリトール	3.0
--------	-----

グリセリン (100%品)	5.0
---------------	-----

ポリオキシエチレン (60) 硬化ヒマシ油	
-----------------------	--

(HCO-60)	0.5
----------	-----

クエン酸ナトリウム	0. 3
クエン酸	0. 1
香料	0. 2
エタノール	8. 0
プロピレングリコール	3. 0
精製水	<u>バランス</u>
合計	100. 0%

請求の範囲

- [請求項1] (A) ヒトディフェンシンと、(B) アスコルビン酸エステル又はその塩とを含有してなることを特徴とする口腔用組成物。
- [請求項2] (A) 成分が、ヒトディフェンシン β -2又はヒトディフェンシン β -3である請求項1記載の口腔用組成物。
- [請求項3] (B) 成分が、アスコルビン酸リン酸エステル及びその塩、アスコルビン酸硫酸エステル及びその塩から選ばれる1種以上である請求項1又は2記載の口腔用組成物。
- [請求項4] (B) 成分が、アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム及び／又はアスコルビン酸リン酸エステルナトリウムである請求項3記載の口腔用組成物。
- [請求項5] (A) 成分を0.000005～0.0005質量%、(B) 成分を0.1～2質量%含有する請求項1乃至4のいずれか1項記載の口腔用組成物。
- [請求項6] (A) 成分に対して(B)成分が質量比で200～400,000倍量である請求項1乃至5のいずれか1項記載の口腔用組成物。
- [請求項7] 歯磨剤又は洗口剤である請求項1乃至6のいずれか1項記載の口腔用組成物。
- [請求項8] 歯周病予防又は治療用である請求項1乃至7のいずれか1項記載の口腔用組成物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/052676

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K8/64(2006.01)i, A61K8/67(2006.01)i, A61K31/375(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P1/02(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61Q11/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K8/64, A61K8/67, A61K31/375, A61K38/00, A61P1/02, A61P31/04, A61Q11/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), Thomson Innovation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-155214 A (Lion Corp.), 16 July 2009 (16.07.2009), entire text (Family: none)	1-8
A	JP 2001-288105 A (Yoshihiro ABIKO), 16 October 2001 (16.10.2001), entire text (Family: none)	1-8
A	WO 2005/027893 A1 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 31 March 2005 (31.03.2005), entire text & US 2007/0093416 A1 & EP 1671629 A1 & CN 1852708 A & KR 10-2006-0076775 A	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent 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 when the document is taken alone

"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

Date of the actual completion of the international search
14 April, 2014 (14.04.14)

Date of mailing of the international search report
22 April, 2014 (22.04.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/052676

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2012-180330 A (Lion Corp.), 20 September 2012 (20.09.2012), entire text (Family: none)	1-8

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K8/64(2006.01)i, A61K8/67(2006.01)i, A61K31/375(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i,
A61P1/02(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61Q11/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K8/64, A61K8/67, A61K31/375, A61K38/00, A61P1/02, A61P31/04, A61Q11/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2014年
日本国実用新案登録公報	1996-2014年
日本国登録実用新案公報	1994-2014年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII), Thomson Innovation

C. 関連すると認められる文献

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	関連する 請求項の番号
A	JP 2009-155214 A（ライオン株式会社）2009.07.16, 全文（ファミリーなし）	1-8
A	JP 2001-288105 A（安彦 善裕）2001.10.16, 全文（ファミリーなし）	1-8
A	WO 2005/027893 A1（大塚製薬株式会社）2005.03.31, 全文 & US 2007/0093416 A1 & EP 1671629 A1 & CN 1852708 A & KR 10-2006-0076775 A	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 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」国際出願日前の出願または特許であるが、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文献

国際調査を完了した日

14.04.2014

国際調査報告の発送日

22.04.2014

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（ISA/J P）
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

神田 和輝

4 D

5 2 7 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3421

C (続き) . 関連すると認められる文献		
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	関連する 請求項の番号
A	JP 2012-180330 A (ライオン株式会社) 2012. 09. 20, 全文 (ファミリーなし)	1-8