

(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
2017年2月2日(02.02.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/018336 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/70 (2006.01)	A61P 17/00 (2006.01)
A23L 33/125 (2016.01)	A61P 17/06 (2006.01)
A61K 8/60 (2006.01)	A61P 19/02 (2006.01)
A61K 31/7004 (2006.01)	A61P 25/00 (2006.01)
A61K 31/7016 (2006.01)	A61P 29/00 (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01)	A61P 37/08 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)	A61Q 1/14 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)	A61Q 17/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)	A61Q 19/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)	A61Q 19/10 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)	

(71) 出願人: 株式会社林原(HAYASHIBARA CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒7028006 岡山県岡山市中区藤崎675番地1 Okayama (JP).

(72) 発明者: 河野 恵三(KOHNO Keizo); 〒7028006 岡山県岡山市中区藤崎675番地1 株式会社林原内 Okayama (JP). 丸田 和彦(MARUTA Kazuhiko); 〒7028006 岡山県岡山市中区藤崎675番地1 株式会社林原内 Okayama (JP). 北村 崇行(KITAMURA Takayuki); 〒7028006 岡山県岡山市中区藤崎675番地1 株式会社林原内 Okayama (JP). 藤田 章弘(FUJITA Akihiro); 〒7028006 岡山県岡山市中区藤崎675番地1 株式会社林原内 Okayama (JP). 森 哲也(MORI Tetsuya); 〒7028006 岡山県岡山市中区藤崎675番地1 株式会社林原内 Okayama (JP). 西本 友之(NISHIMOTO Tomoyuki); 〒7028006 岡山県岡山市中区藤崎675番地1 株式会社林原内 Okayama (JP). 福田 恵温(FUKUDA Shigeharu); 〒7028006 岡山県岡山市中区藤崎675番地1 株式会社林原内 Okayama (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/071510

(22) 国際出願日: 2016年7月22日(22.07.2016)

(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:

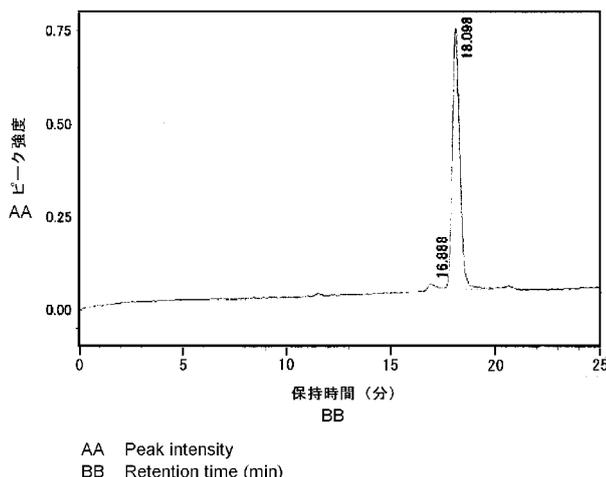
特願 2015-150136	2015年7月29日(29.07.2015)	JP
特願 2016-107837	2016年5月30日(30.05.2016)	JP

[続葉有]

(54) Title: ANTIINFLAMMATORY AGENT

(54) 発明の名称: 抗炎症剤

[図1]



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a safe antiinflammatory agent that is efficacious for ameliorating and improving inflammatory symptoms and for preventing and treating inflammatory diseases and has little side effects. Also, the present invention addresses the problem of providing a cosmetic, quasi-drug, food, drink and drug containing the aforesaid antiinflammatory agent. To solve these problems, provided are an antiinflammatory agent that comprises, as an active ingredient, a saccharide having a ketoaldohexose structure in a molecule and a cosmetic, quasi-drug, food, drink and drug containing the aforesaid antiinflammatory agent.

(57) 要約: 炎症症状の緩和、改善、さらには炎症性疾患の予防、治療に効果的で、且つ、副作用が少ない安全な抗炎症剤を提供することを課題とし、また、前記抗炎症剤を含有する化粧品、医薬部外品、食品及び医薬品を提供することを課題とし、7分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質を有効成分として含有する抗炎症剤及び前記抗炎症剤を含有する化粧品、医薬部外品、食品及び医薬品を提供することにより上記課題を解決する。

WO 2017/018336 A1



- (74) 代理人: 須磨 光夫(SUMA Mitsuou); 〒1050004 東京都港区新橋5丁目19番15号 A. D TAIHEI BLDG. 5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, 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, ST, 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))

明 細 書

発明の名称：抗炎症剤

技術分野

[0001] 本発明は、抗炎症剤に関し、詳細には、腫瘍壊死因子 α （TNF- α ）及びインターロイキン8（IL-8）の産生を抑制することにより抗炎症作用を発揮する、抗炎症剤に関するものである。

背景技術

[0002] 炎症は、生体組織に何らかの有害な刺激を起こす物質（起炎物質）が作用したときに生体が示す局所での一過性の反応であり、生体防御反応の一種である。しかしながら、生体組織に対してもダメージを与えることから、炎症が慢性化した場合、過剰な炎症反応はかえって有害となる。近年、生活スタイルの変化や、大気汚染、排気ガスや過度の紫外線への暴露などによる酸化ストレスの増大などにより、多種多様な炎症性疾患に関する患者数が全体として増大傾向にある。

[0003] スキンケア製品などの化粧品、歯磨きなどの医薬部外品及び口内炎治療剤などの医薬品の抗炎症成分として、グリチルリチン酸ジカリウム（以下、「GK2」と略称する場合がある）が幅広く利用されている。しかしながら、GK2は、マメ科の植物であるカンゾウ（甘草）の根に含まれるグリチルリチン酸の誘導体であり、優れた抗炎症効果を有するものの、ステロイド様作用を有するため、配合比率、使用量の上限が厳しく規定されている。このような状況下、炎症症状の緩和、改善に加え、炎症性疾患の予防、治療のために安心して利用できる抗炎症剤が求められている。

[0004] 一般に糖質は、安全性が高い化合物として認識されており、近年、各種糖質の抗炎症剤としての利用が提案されている。特許文献1には、グルコ二糖であるニゲロース（3-O- α -グルコシルグルコース）やこれを多く含むニゲロオリゴ糖が炎症性サイトカインであるTNF- α 又はインターロイキン6（IL-6）の産生を抑制し、抗炎症剤として使用できることが開示さ

れている。また、特許文献2には、アガロース（寒天）を β -アガラーゼによって分解して得られるネオアガロピオース、ネオアガロテトラオース及びネオアガロヘキサオースからなる糖類がIL-6の産生を抑制し、抗炎症剤として使用できることが開示されている。さらに、非特許文献1には、ケトヘキソースの一種であるD-プシコースが抗炎症作用を有することが開示されている。加えて、特許文献3には、トレハロースとコンドロイチン硫酸とを含有する抗炎症用食品が開示されている。

[0005] しかしながら、上記の糖質を有効成分とする抗炎症剤は、安全性が高い半面、抗炎症作用が比較的弱く、多量に用いないと所期の効果が得られない場合があるなどの問題点があった。このような状況下、炎症症状の緩和、改善に加え、炎症性疾患の予防、治療のために、より効果的で、且つ、副作用が少ない安全な抗炎症剤の開発が望まれている。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：特許第5444425号公報
特許文献2：特許第5154762号公報
特許文献3：特許第3247873号公報

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：ムラオ（K. Mura o）ら、『ライフサイエンス（Life Sciences）』、第81巻、592-599（2007年）

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、炎症症状の緩和、改善、さらには炎症性疾患の予防、治療に効果的で、且つ、副作用が少ない安全な抗炎症剤を提供することを課題とし、また、前記炎症剤を含有する化粧品、医薬部外品、食品及び医薬品を提供することを課題とするものである。さらに、分子内にアルドヘキソース構造を有する糖質の抗炎症作用向上方法を提供することを課題とするものである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、一般的に安全性が高いと期待される糖質を対象に、従来から抗炎症作用を有することが知られている上記糖質より強い抗炎症作用を有する物質を探索した。具体的には、生体における過剰な炎症反応の多くが、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、インターロイキン6 (IL-6)、インターロイキン8 (IL-8)などの炎症性サイトカインの過剰な産生が原因であることに注目し、これらの炎症性サイトカインの産生の抑制を指標にして強い抗炎症作用を有する糖質を探索した。その結果、分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質が、炎症性サイトカインの産生を抑制する作用を強く示しながら、同時に有効な濃度では細胞障害性を示さず、副作用が少ない安全な抗炎症剤の有効成分として利用できることを見出し、本発明を完成させた。

[0010] すなわち、本発明は、分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質を有効成分として含有する抗炎症剤を提供することにより上記課題を解決するものである。

[0011] また、本発明は、分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質を有効成分とする抗炎症剤を含有する化粧品、医薬部外品、食品及び医薬品を提供することにより上記の課題を解決するものである。

[0012] さらに、本発明は、分子内にアルドヘキソース構造を有する糖質において、そのアルドヘキソース構造における他の糖質又は置換基と結合していないフリーの水酸基をケト基に変換することを特徴とする分子内にアルドヘキソース構造を有する糖質の抗炎症作用向上方法を提供することにより上記の課題を解決するものである。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、炎症性サイトカインの産生を抑制する、副作用が少ない安全な抗炎症剤を提供することができる。また、本発明の抗炎症剤によれば、TNF- α 、IL-8などの炎症性サイトカインの産生を顕著に抑制することができるので、これら炎症性サイトカインの過剰産生に起因する炎症症

状の緩和、改善に、さらには炎症性疾患の予防、治療に用いることができる。したがって、本発明の抗炎症剤は、化粧品、医薬部外品、食品、医薬品等の経口剤、外用剤として有利に利用でき、とりわけ、皮膚の炎症に対する抗炎症剤としては、十分な抗炎症作用を有し、高い安全性を有しているため、有利に利用できる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1] 3-ケトトレハロース標品のHPLCクロマトグラムである。

[図2] 3-ケトトレハロース標品の¹³C-NMRスペクトルである。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明は、分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質を有効成分として含有する抗炎症剤に関するものである。

[0016] 本発明でいう「分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質」とは、アルドヘキソース（1位にアルデヒド基を有する六炭糖）において、他の糖質又は置換基と結合していないフリーの水酸基のいずれかが酸化されケト基に変換された構造を分子内に有する糖質及びその誘導体全般を意味する。「分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質」は、その由来、製法を問わず、有機化学的に合成したものであっても、微生物酵素を原料糖質又はその誘導体に作用させる方法（酵素法）により得られるものであっても、また、原料糖質又はその誘導体を炭素源として微生物を培養し変換させる方法（発酵法）により培養液中に得られるものであってもよい。因みに、ヘキソース（六炭糖）は、1位にアルデヒド基を有するアルドヘキソースと、2位にケトン基を有するケトヘキソースに分類され、アルドヘキソースとしては、アロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトース及びタロースの8種が知られている。また、ケトヘキソースとしては、プシコース、フラクトース、ソルボース及びタガトースの4種が知られている。本発明でいう「分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質」は、通常、天然における存在比の高いD体により構成される。

[0017] 本発明の抗炎症剤において有効成分として用いる「分子内にケトアルドヘ

キソース構造を有する糖質」は特に限定されないものの、アルドヘキソースの3位水酸基又は2位水酸基が酸化されケト基に変換された3-ケトアルドヘキソース構造又は2-ケトアルドヘキソース構造を分子内に有する糖質及びその誘導体が好適に用いられる。斯かる分子内に3-ケトアルドヘキソース構造を有する糖質及びその誘導体（以下、本明細書では「3-ケト糖」と略称する。）又は2-ケトアルドヘキソース構造を有する糖質及びその誘導体（以下、本明細書では「2-ケト糖」と略称する。）は、単糖であっても、ホモ又はヘテロの二糖以上のオリゴ糖、さらには多糖であっても好適に用いることができる。

[0018] <3-ケト糖>

本発明における3-ケト糖に包含される単糖としては、例えば、グルコースの3位水酸基が酸化されケト基に変換された3-ケトグルコース、ガラクトースの3位水酸基が酸化されケト基に変換された3-ケトガラクトースなどが挙げられる。また、単糖の誘導体としては、例えば、メチル α -グルコシド又はメチル β -グルコシドのそれぞれのグルコース残基の3位水酸基が酸化されケト基に変換されたメチル α -3-ケトグルコシド又はメチル β -3-ケトグルコシド、メチル α -ガラクトシド又はメチル β -ガラクトシドのそれぞれのガラクトース残基の3位水酸基が酸化されケト基に変換されたメチル α -3-ケトガラクトシド又はメチル β -3-ケトガラクトシドなどが挙げられる。また、その他の単糖の誘導体としては、例えば、1,5-アンヒドログルシトールの3位水酸基が酸化されケト基に変換された1,5-アンヒドロ-3-ケトグルシトールなどが挙げられる。

[0019] 本発明における3-ケト糖に包含される二糖としては、例えば、グルコース2分子が結合した還元性グルコ二糖であるコージビオース（2-0- α -グルコシルグルコース）、ニゲロース（3-0- α -グルコシルグルコース）、マルトース（4-0- α -グルコシルグルコース）、イソマルトース（6-0- α -グルコシルグルコース）及びセロビオース（4-0- β -グルコシルグルコース）の、非還元末端側のグルコース残基の3位水酸基がそれ

ぞれ酸化されケト基に変換された3-ケトコージビオース(2-O- α -3-ケトグルコシルグルコース)、3-ケトニゲロース(3-O- α -3-ケトグルコシルグルコース)、3-ケトマルトース(4-O- α -3-ケトグルコシルグルコース)、3-ケトイソマルトース(6-O- α -3-ケトグルコシルグルコース)及び3-ケトセロビオース(4-O- β -3-ケトグルコシルグルコース)；

非還元性グルコ二糖であるトレハロース(α -グルコシル α -グルコシド、 α 、 α -トレハロース)、ネオトレハロース(α -グルコシル β -グルコシド、 α 、 β -トレハロース)、又はイソトレハロース(β -グルコシル β -グルコシド、 β 、 β -トレハロース)を構成する一方のグルコース残基の3位水酸基がケト基に変換された3-ケトトレハロース、3-ケトネオトレハロース、又は3-ケトイソトレハロース；

トレハロース、ネオトレハロース、又はイソトレハロースを構成する2分子のグルコース残基の2つの3位水酸基がいずれもケト基に変換された3,3'-ジケトトレハロース、3,3'-ジケトネオトレハロース、又は3,3'-ジケトイソトレハロース；

異なる単糖同士が結合したヘテロ二糖である、例えば、グルコースとフラクトースとで構成される非還元性ヘテロ二糖であるスクロース又はイソマルツロースのグルコース残基の3位水酸基がケト基に変換された3-ケトスクロース(O- α -3-ケトグルコシル(1 \rightarrow 2) β -フラクトシド)又は3-ケトイソマルツロース(6-O- α -3-ケトグルコシルフラクトース)；

ガラクトースとグルコースとで構成される還元性ヘテロ二糖であるラクトース(4-O- β -ガラクトシルグルコース)のガラクトース残基の3位水酸基がケト基に変換された3-ケトラクトース(4-O- β -3-ケトガラクトシルグルコース)；が挙げられ、

3-ケト糖に包含される二糖の誘導体としては、マルトース、又はイソマルトースの還元末端グルコースのアルデヒド基が還元された糖アルコールで

あるマルチトール、又はイソマルチトールのグルコース残基の3位水酸基がさらにケト基に変換された3-ケトマルチトール（4-O- α -3-ケトグルコシルソルビトール）、又は3-ケトイソマルチトール（6-O- α -3-ケトグルコシルソルビトール）；ラクトースの還元末端グルコースのアルデヒド基が還元された糖アルコールであるラクチトールの、ガラクトース残基の3位水酸基がさらにケト基に変換された3-ケトラクチトール（4-O- β -3-ケトガラクトシルソルビトール）；などが挙げられる。

[0020] 本発明における3-ケト糖に包含される三糖としては、例えば、メレチトース（3^F-O- α -グルコシルスクロース）、エルロース（4^G-O- α -グルコシルスクロース）の末端グルコース残基の3位水酸基がケト基に変換された3-ケトメレチトース（3^F-O- α -3-ケトグルコシルスクロース）及び3-ケトエルロース（4^G-O- α -3-ケトグルコシルスクロース）や、マルトトリオースの非還元末端グルコース残基の3位水酸基がケト基に変換された3-ケトマルトトリオース（4-O- α -3-ケトグルコシルマルトース）などが挙げられる。

[0021] 分子内にアルドヘキソース構造を有する糖質が、分子内にアルドヘキソース構造を複数有する場合、通常、非還元末端のアルドヘキソースの3位水酸基のみが酸化によりケト化され、3-ケト糖となる。3-ケト糖においては、3-ケトアルドヘキソース構造が抗炎症作用の発揮に関与していると考えられ、分子内において3-ケトアルドヘキソース構造の占める割合が高いものほど強い抗炎症作用を発揮すると考えられる。この観点からは、3-ケト糖としては、分子内の3-ケトアルドヘキソース構造が占める割合の多い二糖又は単糖が抗炎症剤の有効成分として、とりわけ有用である。

[0022] しかしながら、3-ケト糖が単糖である場合、その1位水酸基はアルデヒド基の構造をとり得ることから還元力を示し、さらに3位のケト基がさらに還元力を示すことから反応性に富み、化合物としては不安定となる。本発明の抗炎症剤の有効成分としては、より安定な3-ケト糖が望ましく、単糖である場合は、その1位水酸基が糖以外の置換基と結合することにより、アル

デヒド基の構造を取らずに3位のケト基のみが還元力を示すものがより好適である。このような3-ケト糖の単糖としては、例えば、1位水酸基がメチル化されているメチル α -3-ケトグルコシド、メチル β -3-ケトグルコシドが挙げられる。

[0023] 3-ケト糖が還元性の二糖の場合は、通常、非還元末端側のアルドヘキソースの3位水酸基のみがケト基に変換され、当該アルドヘキソースの1位は他の糖と結合しており同一アルドヘキソース分子内に還元力を示すアルデヒド基がなく、より安定であるため好適に用いることができる。さらには、非還元性の二糖であるトレハロースやスクロースから得られる3-ケトトレハロース、3-ケトスクロースや、トレハロースから得られる3,3'-ジケトトレハロースも好適に用いられる。

[0024] 同様の理由で、二糖の還元末端グルコースのアルデヒド基が還元された糖アルコールは、還元性を示さず化合物としてはさらに安定であるため、好適に用いることができる。そのような、3-ケト糖の二糖の糖アルコールとしては、例えば、3-ケトマルチトール、3-ケトイソマルチトール、3-ケトラクチトールが挙げられる。

[0025] 本発明における3-ケト糖は、3-ケトアルドヘキソース構造を有する糖質である限り、特に限定されないものの、分子内にグルコース構造又はガラクトース構造を有する糖質は、天然に多く存在し、また、これら糖質からは酵素法又は発酵法での3-ケト糖の生成率が高いため、本発明を産業上有利に実施する目的においては、3-ケト糖として分子内に3-ケトグルコース構造又は3-ケトガラクトース構造を有する糖質がとりわけ好適に用いられる。

[0026] 通常、3-ケト糖の調製は、アルドヘキソースの3位水酸基を選択的に酸化して、目的とする3-ケト糖を製造することが出来る3-ケト糖生成酵素を用いた酵素法や発酵法により行われる。

[0027] アルドヘキソースの3位水酸基を酸化してケト基に変換する反応を触媒し、3-ケト糖を生成する酵素としては、グルコシド3-脱水素酵素 (g l u

coside 3-dehydrogenase, EC. 1. 1. 99. 1 3) やピラノース脱水素酵素 (pyranose dehydrogenase, EC. 1. 1. 99. 29) などが知られている。

[0028] また、グルコシド3-脱水素酵素の産生能を有する微生物としては、リゾビウム・ラジオブクター (*Rhizobium radiobacter*、旧分類ではアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*))、フラボバクテリウム・サッカロフィラム (*Flavobacterium saccharophilum*)、スフィンゴバクテリウム・ファエシウム (*Sphingobacterium faecium*)、その他ハロモナス (*Halomonas*) 属、サイトファーガ (*Cytophaga*) 属、アガリクス (*Agaricus*) 属に属する微生物などが挙げられる。

[0029] また、ピラノース脱水素酵素の産生能を有する微生物としては、アガリクス・ビスポラス (*Agaricus bisporus*)、アガリクス・メレアグリス (*Agaricus meleagris*)、アガリクス・ザンソデルマ (*Agaricus xanthoderma*)、マクロレピオタ・ラコドス (*Macrolepiota rhacodes*) などが挙げられる。なお、ピラノース脱水素酵素は、反応条件や反応させる基質によっては、糖質のアルドヘキソースの3位水酸基を酸化するのみならず、2位及び4位の水酸基を酸化する場合があるので、3-ケト糖を選択的に調製したい場合には、アルドヘキソースの3位水酸基のみを選択的に酸化するグルコシド3-脱水素酵素がより好適に用いられる。

[0030] 3-ケト糖は、通常、原料糖質又はその誘導体を含む溶液に上記のグルコシド3-脱水素酵素若しくはピラノース脱水素酵素などの3-ケト糖生成酵素を作用させ、酵素反応により変換 (酸化) されて生成する3-ケト糖を反応液より回収、精製する方法で製造されるか、もしくは、原料となる糖質又はその誘導体を炭素源として含む液体培地で、上記のグルコシド3-脱水素酵素若しくはピラノース脱水素酵素などの3-ケト糖生成酵素の産生能を有

する微生物を培養し、培養液中において原料糖質又はその誘導体が微生物変換（酸化）されて生成する3-ケト糖を培養液より回収、精製する方法で製造される。3-ケト糖の反応液もしくは、培養液からの回収、精製は、遠心分離による菌体や酵素の除去、培養液及び反応液上清の加熱処理により不溶化するタンパク質等の除去、アルコール沈殿処理などによる高分子多糖類の除去、活性炭による脱色、イオン交換樹脂又は電気透析器を用いた脱塩、イオン交換樹脂などを用いたクロマトグラフィー、アルコールを用いた3-ケト糖の結晶化など種々の操作を適宜組合せて行うことができる。

[0031] 上記した種々の3-ケト糖の内、とりわけ3-ケトマルトース、3-ケトスクロース、3-ケトラクトース、3-ケトトレハロースなどの3-ケト二糖は、マルトース、スクロース、ラクトース、トレハロースなど汎用の二糖を原料として得られ、また、分子内に3-ケトグルコース構造又は3-ケトガラクトース構造を有し、いずれも結晶の形態で得られることが知られていることから、高純度品を比較的効率よく製造することができるので、本発明の抗炎症剤の有効成分として、より好適に用いることができる。

[0032] <2-ケト糖>

本発明における2-ケト糖は、2-ケトアルドヘキソース構造を有する糖質である限り、特に限定されないものの、本発明において好適に用いられる2-ケト単糖又は2-ケト二糖としては、例えば、2-ケトグルコース（2-デヒドロ-D-グルコース）、2-ケトトレハロース、2-ケトネオトレハロース、2-ケトイソトレハロースなどが挙げられる。

[0033] 2-ケト糖の調製は、通常、グルコースの2位水酸基を選択的に酸化して、2-ケトグルコースを製造することが出来るピラノース2-オキシダーゼ（EC 1. 1. 3. 10）を用いた酵素法により行われる。また、ピラノース2-オキシダーゼの産生能を有する微生物としては、キノコ類、例えば、カワラタケ（*Trametes versicolor*、*Trametes multicolor*）、担子菌（*Basidiomycete fungus*）などが挙げられる。2-ケトグルコースや、2-ケトグルコース

を受容体とした糖転移反応により得られる2-ケトトレハロースなどの2-ケト糖も、上述の3-ケト糖の項で述べたと同様の方法で精製、単離することができる。

[0034] 後述する実験3などに示すとおり、3-ケト二糖である3-ケトトレハロース、3-ケトラクトース、3-ケトコジビオース、3-ケトイソマルトース、3-ケトマルトース、3-ケトスクロース、3-ケト二糖の糖アルコールである3-ケトマルチトール、及び、2-ケト糖である2-ケトグルコース及び2-ケトトレハロースは、TNF- α 又はIL-8の産生抑制作用を有意に発揮する濃度において、細胞増殖や細胞の生存率に悪影響を及ぼすことがないことから、3-ケト糖及び2-ケト糖などの分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質は、生体に適用して安全な糖質であると考えられる。

[0035] 先に述べたとおり、生体における過剰な炎症反応の多くは、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、インターロイキン6 (IL-6)、インターロイキン8 (IL-8)などの炎症性サイトカインの過剰な産生が原因であると言われている。

[0036] TNF- α は、主として活性化マクロファージから産生される炎症性サイトカインであり、TNF- α が過剰に産生されることにより炎症反応が強まると共に、好中球等の細胞障害性のある細胞を強く活性化することにより血管内皮細胞や組織の障害が誘導され、臓器の機能不全につながることも報告されている。また、TNF- α は肥満により肥大化した脂肪細胞からも産生され、インスリン抵抗性を誘導することによりII型糖尿病の発症と病態形成に関与することもわかっている。一般に、TNF- α の過剰産生は、皮膚炎、関節リウマチ、乾癬、炎症性腸疾患などの炎症に関与していると言われている。一方、IL-8は、好中球を炎症局所に浸潤させる炎症性サイトカインとして知られている。炎症局所に浸潤した好中球は脱顆粒を起こすことによって、ミエロパーオキシダーゼやエラスターゼ等の組織障害作用のある酵素が放出される。そのため、炎症反応が長期化すると組織障害も見られる

ようになる。一般に、IL-8の過剰産生は、関節リウマチ、乾癬、気管支喘息、敗血症、血管炎症、肝炎などの炎症に関与していると言われている。すなわち、炎症の発症又は増悪を引き起こす炎症性サイトカインの過剰な産生を抑制することは、炎症症状の緩和、改善に加え、炎症性疾患の予防、治療に有効であると期待される。

[0037] 本発明における分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質は、後述する実験の項で示すように、ヒトの皮膚線維芽細胞、表皮ケラチノサイト、歯肉線維芽細胞、腸管上皮細胞などにおいて、TNF- α 、IL-8などの産生を抑制することから、経口摂取しても、また、皮膚に塗布してもその作用効果を発揮し、TNF- α 、IL-8など炎症性サイトカインの過剰産生が関与する炎症に対する抗炎症剤として有利に利用できる。

[0038] また、活性酸素種による酸化ストレスが細胞障害を引き起こし、炎症性疾患を含む様々な疾患や老化現象に直接関与していることが報告されており、活性酸素種による細胞障害を予防することが炎症性疾患の予防、治療にも有効であると考えられている。本発明の抗炎症剤の有効成分である3-ケト糖は、抗酸化作用を有するため、この点においても抗炎症剤として有用である。

[0039] 一般に、炎症は急性炎症と慢性炎症に二つに大別される。急性炎症は、外部からの浸襲刺激に対して発赤、腫脹、発熱、疼痛が主な徴候として現われ、炎症の原因物質や感染が無くなり、障害を受けた組織、細胞が元通りに修復すれば症状が収束方向に向かうため、短期間に終結する。一方、慢性炎症は、不完全もしくは過剰な生体免疫応答により組織の構造変化と機能欠損が惹起されるため、症状が急性炎症と比較すると長期間維持される。

[0040] 慢性炎症に該当する疾患としては、例えば、花粉症のようなアレルギー、慢性呼吸器疾患、喘息、敗血症、慢性関節リウマチ、ARDS（急性呼吸促進症候群）、肝炎、胃炎、炎症性腸疾患、膵炎、関節炎、動脈硬化、虚血再灌流障害、ブドウ膜炎、エンドトキシンショック、熱傷、ウイルス性心筋炎、特発性拡張型心筋症、SIRS（全身性炎症反応症候群）、多臓器不全、

溶血性尿毒症症候群や出血性大腸炎をはじめとする血管内皮細胞障害に起因する疾患、高 γ -グロブリン血症、全身性エリトマトーデス（SLE）、アテローム性動脈硬化症、多発性硬化症、モノクローナルB細胞異常症、ポリクローナルB細胞異常症、心房粘液腫、カストルマン症候群、原発性糸球体腎炎、メサンギウム増殖性腎炎、糖尿病性腎炎などの腎炎、閉経後骨粗鬆症、歯肉炎、歯周病、アレルギー性皮膚炎、アトピー性皮膚炎などの皮膚の炎症が挙げられる。ちなみに、上記肝炎としてはアルコール性肝炎、ウイルス性肝炎、薬剤性肝炎、非アルコール性脂肪肝、自己免疫性肝炎、肝線維化、肝硬変及び劇症肝炎などを例示することができる。また、炎症性腸疾患としては潰瘍性大腸炎、クローン病などを例示することができる。さらに、神経細胞の炎症に起因する神経変性疾患として、パーキンソン病、アルツハイマー病なども挙げられる。慢性炎症は、上記のような炎症性疾患のみにとどまらず、肥満、メタボリックシンドローム、糖尿病、動脈硬化性疾患などの生活習慣病の共通基盤になっている。

[0041] 本発明の抗炎症剤の有効成分である分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質は、安全性の高い物質であり、長期間にわたり経口剤、外用剤として有利に利用できるため、とりわけ慢性炎症に対する抗炎症剤として有効に利用できる。有効成分である分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質を配合する場合、抗炎症剤に対して0.1乃至90質量%（以下、特にことわらない限り本明細書では質量%を「%」と表記する）含有せしめるのが望ましく、10乃至90%含有せしめるのがより望ましい。

[0042] 本発明の抗炎症剤の有効成分である分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質は、安全性、抗炎症効果、TNF- α 、IL-8など炎症性サイトカインの産生抑制作用に影響を及ぼさない限り、製造原料由来の成分や製造過程で生じる副生成物を含んでいる標品であってもよい。しかしながら、できるだけ高純度のものを用いるのが望ましく、通常、固形物換算で、純度80%以上、望ましくは純度90%以上、より望ましくは純度95%以上のものが好適に用いられる。

[0043] また、本発明の抗炎症剤は、化粧品、医薬部外品、食品、医薬品などの各種組成物に配合することができる。有効成分である分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質の各種組成物への配合量は、抗炎症作用を発揮できる量であればよく、特に制限はないが、通常、化粧品、医薬部外品、食品又は医薬品の総質量に対して、無水物換算で、0.01%以上、望ましくは、0.1%以上を含有せしめるのが好適であり、0.2%以上が特に望ましい。通常0.01%未満では、抗炎症効果を発揮するには不十分な場合がある。

[0044] 本発明の抗炎症剤は、単独でも抗炎症作用を発揮することができるものの、抗炎症作用を有する公知の成分と併用することも有利に実施できる。

[0045] 抗炎症作用を有する公知の成分としては、例えば、アラントイン又はその誘導体、グリチルレチン又はその誘導体、パントテン酸又はその誘導体、ビタミンE又はその誘導体、L-アスコルビン酸又はその誘導体、塩酸ピリドキシン、メントール、ビオチン、カンフル、テレピン油、酸化亜鉛、アズレン、グアイアズレン及びその誘導体、メフェナム酸及びその誘導体、フェニルブタゾン及びその誘導体、インドメタシン及びその誘導体、イブプロフェン及びその誘導体、ケトプロフェン及びその誘導体、 ϵ -アミノカプロン酸、ジクロフェナクナトリウム、ジフェンヒドラミン、トラネキサム酸及びその誘導体、デキサメタゾン、コルチゾン及びそのエステル、ヒドロコルチゾン及びそのエステル、プレドニゾン、プレドニゾンなどの副腎皮質ホルモン、藍、アセンヤク、アマチャ、アルテア、アルニカ、アロエ、イブトラノオ、イラクサ、ウコン、エイジツ、エチナシ、エンメイソウ、オウゴン、オウバク、オオムギ、オトギリソウ、オドリコソウ、オレンジ、カノコソウ、カミツレ、カモミラエキス、カロット、カワラヨモギ、カンゾウ、キュウリ、キンギンカ、クチナシ、クマザサ、クレソン、クワ、ゲンチアナ、ゲンノショウコウ、ゴカヒ、ゴボウ、コンフリー、サルビア、サンショウ、シコン、シソ、シモツケソウ、シャクヤク、シラカバ、スギナ、セイヨウオトギリソウ、セイヨウキズタ、セイヨウネズ、セイヨウハッカ、セージセンキュウ

、センブリ、ソハクヒ、タイソウ、タイム、チャ、チンピ、テンチャ、トウガシ、トウキ、トウキンセンカ、トウニン、ドクダミ、トルメンチラ、ニワトコ、ニンジン、パセリ、ハッカ、バラ、ビャクダン、ビワ、ブクリョウ、ブッチャーブルーム、ブドウ、ブロッコリー、ベニバナ、ホオウ、ボダイジュ、ボタン、マロニエ、ムクロジ、モモ、ヤグルマギク、ヤグルマソウ、ユーカリエキス、ヨウバイヒ、ヨモギ、ラベンダー、ローズヒップ、ローズマリー、ローマカミツレなどの植物又は植物由来成分などが挙げられる。

[0046] 本発明の抗炎症剤を含有する組成物の製造にあたっては、有効成分である上記分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質の少なくとも1種以上と、化粧品、医薬部外品、食品、医薬品等を製造する場合において通常用いられている任意成分を適宜配合すればよい。剤の形態は特に限定されず外用剤や経口剤とすることができる。

[0047] 本発明の抗炎症剤を含有する組成物が化粧品である場合は、任意成分として、精製水、pH調製剤、低級アルコール、多価アルコール、油脂類、ロウ類、炭化水素類、脂肪酸類、エステル類、有機溶媒、シリコーン類、界面活性剤、増粘剤、軟化剤、乳化剤、消泡剤、加湿剤、芳香剤、金属イオン封鎖剤、染料、着色材、水溶性高分子、防腐剤、緩衝液、色素、紫外線吸収剤、収斂剤、殺菌・抗菌剤、保湿剤、細胞賦活剤、消炎・抗アレルギー剤、抗酸化・活性酸素除去剤、香料、各種薬効成分等を配合することができる。

[0048] 本発明の抗炎症剤を含有する化粧品としては、化粧石鹸、洗顔クリーム、洗顔フォーム、クレンジングクリーム、クレンジングミルク、クレンジングローション、クレンジングオイル、マッサージクリーム、コールドクリーム、モイスチャークリーム、バニシングクリーム、ハンドクリーム、モイスチャーローション、化粧油、リキッドファンデーション、パウダーファンデーション、ケーキ状ファンデーション、スティックファンデーション、油性コンパクトファンデーション、クリーム状ファンデーション、チークブラッシャー、乳化ファンデーション、下地化粧品、ボディパウダー、クリーム状白粉、粉白粉、水白粉、固型白粉、タルカムパウダー、練り白粉、ルーズシャ

ドウ、ベビーパウダー、ほお紅、眉墨、マスカラ、リップスティック、リップクリーム、パック、シェービングクリーム、アフターシェービングクリーム、ローション、ハンドローション、シェービングローション、アフターシェービングローション、日焼け止めクリーム、日焼け用オイル、日焼け止めローション、日焼け用ローション、柔軟化粧水、収斂化粧水、洗浄化粧水、多層式化粧水、フェイシャルシャンプー、ボディシャンプー、ヘアシャンプー、髪洗い粉、ハンドソープ、フェイシャルリンス、ボディリンス、ヘアリンス、ヘアトリートメント、チック、ポマード、ヘアクリーム、ヘアリキッド、ヘアトニック、セットローション、スキ油、鬢付け油、ヘアスプレー、ヘアムース、ヘアトニック、ヘアダイ、ヘアブリーチ、カラーリンス、カラスプレー、パーマメントウェーブ液、プレスパウダー、ルースパウダー、アイクリーム、アイシャドー、クリームアイシャドー、パウダーアイシャドー、アイライナー、アイブラウペンシル、マスカラ、脱毛クリーム、一般香水、練り香水、粉末香水、オーデオロン、デオドラント、浴用剤、バスオイル、バスソルト、化粧用油、ベビーオイル、ネイルカラー、エナメル、エナメル除去液、ネールトリートメントなどが挙げられる。

[0049] 本発明の抗炎症剤を含有する組成物が医薬部外品の場合は、任意成分として、賦形剤、基剤、界面活性剤、分散剤、可溶化剤、溶剤、アルカリ剤、粘度調節剤、増粘剤、皮膜剤、起泡剤、消泡剤、着香剤、着色剤、安定剤、防腐剤、殺菌剤、退色防止剤、酸化防止剤、毛髪処理剤、湿潤剤、毛髪保護剤、毛胞賦活剤、帯電防止剤、助剤、溶剤、溶解剤、溶解補助剤、流動化剤、懸濁剤、緩衝剤、結合剤、吸着剤、噴射剤、コーティング剤、咀嚼剤、充填剤、軟化剤、調整剤、金属封鎖剤、褪色防止剤、油脂、油溶性高分子、鎮痛剤、崩壊剤、滑沢剤、乳化剤、等張化剤などの慣用の添加剤を配合することができる。

[0050] 本発明の抗炎症剤を含有する医薬部外品としては、口腔に用いられる医薬部外品、例えば、歯磨き、マウスウォッシュ、マウスリンス、ドリンク剤、頭皮に用いられる医薬部外品、例えば、養毛剤、育毛剤、脱毛防止剤、除毛

剤、マッサージ料、それ以外には、虫除け剤、外傷治療用軟膏、抗菌クリーム、ステロイド軟膏、口腔内や皮膚の患部に貼り付けるシート状やフィルム状のはっぴ剤、美容液、薬用石鹸、清浄綿、浴用剤、ベビーパウダー、ソフトコンタクトレンズ用消毒剤などが挙げられる。

[0051] 本発明の抗炎症剤を含有する組成物が食品の場合は、任意成分として、水、アルコール、澱粉質、蛋白質、繊維質、糖質、脂質、ビタミン、ミネラル、着香料、着色料、甘味料、調味料、安定剤、防腐剤のような食品に通常配合される原料又は素材等を配合することができる。

[0052] 本発明の抗炎症剤を含有する食品としては、飲料、スープ、アルコール飲料、ゼリー、ハードキャンディ、ソフトキャンディ、グミキャンディ、チューインガム、チョコレート、タブレット、冷菓等が挙げられる。食品には、機能性食品、健康食品、健康志向食品等も含まれる。

[0053] 本発明の抗炎症剤を含有する医薬品の形態としては、散剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、細粒剤、顆粒剤等の固形製剤、水剤、懸濁剤、乳剤等の液剤、ゲル剤等が挙げられる。錠剤、丸剤、顆粒剤、顆粒を含有するカプセル剤の顆粒は、必要により、ショ糖等の糖類、マルチトール等の糖アルコールで糖衣を施したり、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース等でコーティングを施してもよいし、胃溶性若しくは腸溶性物質のフィルムで被覆してもよい。また、製剤の溶解性を向上させるために、前記の製剤を公知の可溶化処理を施すこともできる。常法に基づいて、前記液剤を注射剤、点滴剤に配合して使用してもよい。

[0054] 本発明の抗炎症剤を含有する医薬品を使用する場合、その投与量又は摂取量は、所望の改善、治療又は予防効果が得られるような量であれば特に制限されず、通常その態様、患者の年齢、性別、体質その他の条件、疾患の種類並びにその程度等に応じて適宜選択される。例えば、該医薬品中に有効成分である分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質を無水物換算で、0.01乃至30%の含量となるように配合し、分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質として1日当たり約0.1mg乃至1,000mgの範

困で摂取させればよい。

[0055] また、本発明の抗炎症剤は、安全性に優れたものであるので、ヒトに対してだけでなく、例えば、非ヒト動物、例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー等の哺乳類、鳥類、両生類、爬虫類等の治療剤、飼料又は餌料に配合してもよい。飼料又は餌料としては、例えばヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ニワトリ等に用いる家畜用飼料、ウサギ、ラット、マウス等に用いる小動物用飼料、ウナギ、タイ、ハマチ、エビ等に用いる魚介類用飼料、イヌ、ネコ、小鳥、リス等に用いるペットフードなどが挙げられる。

[0056] また、本発明の抗炎症作用の向上方法によれば、分子内にアルドヘキソース構造を有する糖質における、他の糖質又は置換基と結合していないフリーの水酸基をケト基に変換することにより、抗炎症作用が弱い糖質の抗炎症作用を向上させることができるので、アルドヘキソース構造を有する糖質の抗炎症作用の向上方法としても有用である。

[0057] 当該抗炎症作用の向上方法として好適な方法としては、アルドヘキソース構造における3位水酸基又は2位水酸基を酵素法又は発酵法によりケト基へ変換させる方法が挙げられ、当該方法の場合、アルドヘキソース構造を分子内に有する糖質の非還元末端のアルドヘキソースの3位水酸基又は2位水酸基が酸化され、当該糖質の抗炎症作用が変換前に比べて向上する。

[0058] 以下、本発明につき実験により具体的に説明する。

[0059] <実験1：各種3-ケト糖の調製>

トレハロース、コージビオース、イソマルトース、ラクトース、マルトース、スクロース及びマルチトールをそれぞれ原料糖質として、発酵法により3-ケトトレハロース、3-ケトコージビオース、3-ケトイソマルトース、3-ケトラクトース、3-ケトマルトース、3-ケトスクロース及び3-ケトマルチトールを調製した。加えて、トレハロース及びメチル α -グルコシドをそれぞれ原料糖質として、酵素法により3,3'-ジケトトレハロース及びメチル α -3-ケトグルコシドを調製した。

[0060] <実験 1-1 : 3-ケトトレハロースの調製>

トレハロース（登録商標『トレハ』、株式会社林原販売、トレハロース純度98.0%以上）20（w/v）%、ポリペプトン（日本製薬株式会社製）1（w/v）%、酵母エキスS（日本製薬株式会社製）0.2（w/v）%、硫酸マグネシウム7水和物0.01（w/v）%、及び水からなる液体培地（pH6.8）を試験管1本当たり3mL入れ、オートクレーブで121℃、20分滅菌し、冷却した後、寒天スラント培地にて27℃で培養したフラボバクテリウム・サッカロフィラム NBRC15944株を一白金耳接種し、27℃で72時間、270rpmで振とう培養したものをシード培養液とした。

[0061] 上記と同じ組成を有する液体培地を、500mL容三角フラスコに50mL入れたものを50本調製し、pH6.8に調整後、121℃で20分間滅菌し、冷却した後、上記のシード培養液をそれぞれの三角フラスコ1本に対して、0.5mLずつ接種した後、27℃で72時間、240rpmで回転振とう培養しメイン培養液とした。培養液の糖組成をHPLCにより分析したところ、原料であるトレハロース以外の新しい糖質ピークが確認された。

[0062] 培養終了後、得られた約2,300mLの培養液を10,000rpmで遠心分離することにより菌体を除去し、得られた培養上清液を100℃の湯浴中で加熱処理し、さらに10,000rpmで遠心分離して不溶物を除去して上清を回収した。得られた上清液にエタノール9,200mLを添加し、10,000rpmで遠心分離して上清を回収した。回収した溶液をエバポレーターにて減圧下で1,100mLに濃縮し、0.2μmメンブランフィルターにてろ過した後、電気透析器（商品名『マイクロアシライザー G0』、旭化成工業株式会社製）に供し脱塩した。得られた電気透析液を0.2μmメンブランフィルターでろ過し、下記条件による分取HPLCに供し、原料トレハロースから新たに生成した糖質のピーク画分を分取し、濃縮し、凍結乾燥にて粉末化し、標品76.5gを得た。

[0063] （分取HPLC条件）

カラム：YMC-Pack ODS-AQ

(内径50mm、長さ500mm、株式会社ワイエムシイ製)

溶離液：超純水

流速：5.0mL/分

カラム温度：25℃

検出：示差屈折計

[0064] 得られた標品を下記条件によるHPLC分析に供し、HPLCクロマトグラム(図1)に基づき、純度を98.1%と決定した。また、当該標品を、LC/MS分析に供したところ、トレハロースの分子量342よりも2(水素原子2つ分)小さい分子量340を有することが判明した。さらに、当該標品を試料としてNMR($^1\text{H-NMR}$ 及び $^{13}\text{C-NMR}$)スペクトルを測定したところ、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル(図2)において、トレハロースを構成する2つのグルコース残基の片方のグルコース残基の3位炭素のシグナルが大きく低磁場側にシフトしていることが確認(国立研究開発法人産業技術総合研究所が提供している有機化合物のスペクトルデータベース(SDBS)『http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi』に記載の原料トレハロースの $^{13}\text{C-NMR}$ データとの比較)され、本標品が3-ケトトレハロースであることが判明した。

[0065] (分析用HPLC条件)

装置：Prominence(株式会社島津製作所製)

カラム：Shodex SUGAR KS-801

(内径8mm、長さ300mm、昭和電工株式会社製)

溶離液：超純水

流速：0.4mL/分

カラム温度：75℃

検出：示差屈折計

[0066] <実験1-2：3-ケトコージビオースの調製>

マルトース5.0%(w/v)、酵母エキスS(日本製薬株式会社製)0

、 1 (w/v)、魚肉エキス (マルハ株式会社製) 0.3 (w/v) %、リン酸水素 2 カリウム 0.01 (w/v) %、リン酸 2 水素ナトリウム 1 水和物 0.06 (w/v) %、硫酸マグネシウム 7 水和物 0.05 (w/v) %、硫酸鉄 7 水和物 0.001 (w/v) %、硫酸マンガン n 水和物 0.001 (w/v) %、炭酸カルシウム 0.3 (w/v) % 及び水からなる液体培地 (pH 6.8) を試験管 1 本当たり 3 mL 入れ、オートクレーブで 121 °C、20 分滅菌し、冷却した後、寒天スラント培地にて 27 °C で培養したリゾビウム・ラジオバクター G37 株を一白金耳接種し、27 °C で 72 時間振とう培養したものをシード培養液とした。

[0067] マルトースをコージビオース (株式会社林原調製品、純度 95.9%) に替えた以外は上記と同じ組成を有する液体培地を、500 mL 容三角フラスコに 50 mL 入れたものを 10 本調製し、pH 6.8 に調整後、121 °C で 20 分間滅菌し、冷却した。次いで、上記のシード培養液をそれぞれの三角フラスコ 1 本に対して、0.5 mL ずつ接種した後、27 °C で 54 時間、回転振とう培養しメイン培養液とした。培養液の糖組成を HPLC により分析したところ、原料であるコージビオース以外の新しい糖質ピークが確認された。

[0068] 培養終了後、得られた約 500 mL の培養液に脱イオン水 1,200 mL を添加し希釈した後、8,000 rpm で遠心分離することにより菌体を除去し、得られた遠心上清にエタノール 5,100 mL を添加し、沈殿物をろ過にて除いた。次いで、ろ液をエバポレーターにて減圧下で 250 mL に濃縮し、得られた濃縮液にエタノール 500 mL を添加し、8,000 rpm で遠心分離して上清を回収した。回収した溶液をエバポレーターにて減圧下で 300 mL に濃縮し、11,000 rpm で遠心分離して上清を回収し、0.2 µm メンブランフィルターにてろ過した後、電気透析器 (商品名『マイクロアシライザー G1』、旭化成工業株式会社製) に供し脱塩した。得られた電気透析液をエバポレーターにて減圧下で約 20 mL に濃縮し、0.2 µm メンブランフィルターでろ過し、下記条件による分取 HPLC を繰り返す。

返して、原料コージビオースから新たに生成した糖質のピーク画分を分取し、濃縮し、凍結乾燥にて粉末化し、標品 8.7 g を得た。得られた標品の純度を HPLC により分析したところ、91.2% であった。実験 1-1 で 3-ケトトレハロースについて行ったと同様の LC/MS 分析、 ^{13}C -NMR スペクトル分析により分析したところ、得られた標品が 3-ケトコージビオース (2-O- α -3-ケトグルコシルグルコース) であることが判明した。

[0069] (分取 HPLC 条件)

カラム : YMC-Pack R&D ODS-A

(内径 20 mm、長さ 250 mm、株式会社ワイエムシイ製)

溶離液 : 超純水

流速 : 3.5 mL/分

カラム温度 : 35°C

検出 : 示差屈折計

[0070] <実験 1-3 : 3-ケトイソマルトースの調製>

メイン培養に用いる液体培地の糖質をイソマルトース (株式会社林原調製品、純度 97.7%) に替えた以外は実験 1-2 と同様にリゾビウム・ラジオバクター G37 株を培養し、同様の操作により精製したところ、脱塩後の濃縮液から結晶が析出した。結晶懸濁液から遠心分離により結晶を回収し、特級エタノールにて洗浄し、オーブン (40°C) で乾燥することにより、標品 6.0 g を得た。得られた標品の純度を HPLC により分析したところ、98.5% であった。実験 1-1 で 3-ケトトレハロースについて行ったと同様の手法により分析したところ、得られた標品が 3-ケトイソマルトース (6-O- α -3-ケトグルコシルグルコース) であることが判明した。

[0071] <実験 1-4 : 3-ケトラクトースの調製>

ラクトース 2.0% (w/v)、酵母エキス (Difco 株式会社製) 0.1 (w/v)% 及び水からなる液体培地 (pH 6.8) をシード培養及びメイン培養に用い、500 mL 容三角フラスコに培地 100 mL を入れたも

のを3本用いた以外は、実験1-2と同様にリゾビウム・ラジオバクター G37株を培養した。培養液の糖組成をHPLCにより分析したところ、原料であるラクトース以外の新しい糖質ピークが確認された。

[0072] 培養終了後、得られた培養液約300mLを珪藻土ろ過することにより菌体を除去し、ろ液をエバポレーターにて減圧濃縮し、得られた濃縮液を実験1-2に準じた分取HPLCに供し、新たに生成した糖質のピーク画分を分取した。分取した溶液を活性炭で脱色ろ過し、ろ液をエバポレーターにて減圧濃縮し、濃縮液の5倍量のメタノールを添加し室温に放置したところ、約1週間で結晶が析出した。結晶懸濁液を濾過して結晶を回収し、真空乾燥することにより標品3.8gを得た。得られた標品の純度をHPLCにより分析したところ、98.6%であった。実験1-1で3-ケトトレハロースについて行ったと同様の手法により分析したところ、得られた標品が3-ケトラクトース(4-O-β-3-ケトガラクトシルグルコース)であることが判明した。

[0073] <実験1-5：3-ケトマルトースの調製>

マルトース5.0% (w/v)、ビール酵母エキス(オリエンタル酵母工業株式会社製)0.02 (w/v)、ソルリス095E(オリエンタル酵母工業株式会社製)0.04 (w/v) %、クエン酸2アンモニウム0.45 (w/v) %、リン酸水素2アンモニウム0.45 (w/v) %、コハク酸アンモニウム0.60 (w/v) %、リン酸水素二カリウム0.10 (w/v) %、塩化カルシウム2水和物0.05 (w/v) %、硫酸マグネシウム7水和物0.05 (w/v) %、硫酸鉄7水和物0.005 (w/v) %、ミネラル酵母Zn0.001 (w/v) %及び水からなる液体培地(pH6.8)を試験管1本当たり3mL入れ、オートクレーブで121℃、20分滅菌し、冷却した後、寒天スラント培地にて27℃で培養したリゾビウム・ラジオバクター G37株を一白金耳接種し、27℃で48時間振とう培養したものをシード培養液とした。

[0074] 上記と同じ組成を有する液体培地を、500mL容三角フラスコに50m

L入れたものを20本調製し、pH 6.8に調整後、121℃で20分間滅菌し、冷却した。次いで、上記のシード培養液をそれぞれの三角フラスコ1本に対して、0.5 mLずつ接種した後、27℃で72時間、回転振とう培養しメイン培養液とした。培養液の糖組成をHPLCにより分析したところ、原料であるマルトース以外の新しい糖質ピークが確認された。

[0075] 培養終了後、得られた約1 Lの培養液を10,000 rpmで遠心分離することにより菌体を除去し、得られた遠心上清を100℃で10分間加熱処理した後、再び10,000 rpmで遠心分離した。得られた遠心上清にエタノール2,700 mLを添加し、さらに10,000 rpmで遠心処理を行った。次いで、遠心上製をエバポレーターにて減圧下で500 mLに濃縮し、得られた濃縮液を0.22 μmメンブランフィルターにてろ過した後、実験1-1と同じ条件による分取HPLCを繰り返して、原料マルトースから新たに生成した糖質のピーク画分を分取し、濃縮し、凍結乾燥にて粉末化し、標品5.1 gを得た。得られた標品の純度をHPLCにより分析したところ、96.2%であった。実験1-1で3-ケトトレハロースについて行ったと同様の手法により分析したところ、得られた標品が3-ケトマルトース(4-O- α -3-ケトグルコシルグルコース)であることが判明した。

[0076] <実験1-6：3-ケトスクロースの調製>

シード培養及びメイン培養に用いる液体培地の糖質をスクロース(和光純薬工業株式会社、試薬特級)に替えた以外は実験1-5と同様にリゾビウム・ラジオバクター G37株を培養した。培養液の糖組成をHPLCにより分析したところ、原料であるスクロース以外の新しい糖質ピークが確認された。培養終了後、3-ケトマルトースとほぼ同様の操作により精製し、標品7.5 gを得た。得られた標品の純度をHPLCにより分析したところ、90.3%であった。実験1-1で3-ケトトレハロースについて行ったと同様の手法により分析したところ、得られた標品が3-ケトスクロース(O- α -3-ケトグルコシル(1 \rightarrow 2) β -フラクトシド)であることが判明した。

[0077] <実験 1-7 : 3-ケトマルチトールの調製>

シード培養及びメイン培養に用いる液体培地の糖質をマルチトール（東京化成工業株式会社、純度 93.0%以上）に替え、濃度を 3%に変更した以外は実験 1-5 と同様にリゾビウム・ラジオバクター G37 株を培養した。培養液の糖組成を HPLC により分析したところ、原料であるマルチトール以外の新しい糖質ピークが確認された。培養終了後、3-ケトマルトースと同様の操作により精製し、標品 9.4 g を得た。得られた標品の純度を HPLC により分析したところ、90.2%であった。実験 1-1 で 3-ケトトレハロースについて行ったと同様の手法により分析したところ、得られた標品が 3-ケトマルチトール（4-O- α -3-ケトグルコシルソルビトール）であることが判明した。

[0078] <実験 1-8 : 3, 3'-ジケトトレハロースの調製>

スクロース 1.0 (w/v) %、トレハロース 4.0 (w/v) %、尿素 0.09 (w/v) %、硫酸マグネシウム七水和物 0.015 (w/v) %、硫酸鉄七水和物 0.001 (w/v) %、クエン酸一水和物 0.017 (w/v) %、リン酸二水素カリウム 0.107 (w/v) %、リン酸二水素ナトリウム二水和物 0.217 (w/v) %を含む液体培地を pH 6.8 に調整後、試験管 1 本当たり 3 mL 入れ、オートクレーブで 121°C、20 分滅菌し、冷却した後、フラボバクテリウム・サッカロフィラム NBRC 15944 株をグリセロールストックから 30 μ L 接種した。27°C で 96 時間振とう培養したものをシード培養液とした。

[0079] 上記と同じ組成を有する液体培地を、500 mL 容三角フラスコに 100 mL 入れたものを 40 本調製し、pH 6.8 に調整後、121°C で 20 分間滅菌し、冷却した。次いで、上記のシード培養液をそれぞれの三角フラスコ 1 本に対して、1 mL ずつ接種した後、27°C で 24 時間、回転振とう培養しメイン培養液とした。

[0080] 上記メイン培養液を 10,000 rpm で遠心分離した。遠心上清は除去し、得られた菌体に Triton X-100、リゾチームを添加し、室温

で1時間攪拌した。次いで、 -80°C に1時間置くことで凍結し、 38°C の湯浴中で1時間融解した。次いで、超音波破碎を行い、 $10,000\text{rpm}$ で遠心分離した。得られた遠心上清をグルコシド3-脱水素酵素の粗酵素液とした。

[0081] グルコシド3-脱水素酵素の活性は、概略、以下の原理に基づき測定した。すなわち、メチル α -グルコシドを基質とし、グルコシド3-脱水素酵素がメチル α -グルコシドを酸化しメチル α -3-ケトグルコシドに変換する際にグルコシド3-脱水素酵素の補酵素であるフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)が還元され、還元型FAD(FADH₂)が生成することから、フェナジンメトサルフェイト(PMS)とジクロロインドフェノール(DCIP)を共役させ、最終的に酸化型DCIPの減少(還元型DCIPの生成)を波長 660nm の吸光度を測定することでメチル α -グルコシドの酸化活性を評価した。具体的には、適宜希釈した酵素液をマイクロプレートのウェルに $195\mu\text{L}$ 入れ、これに、メチル α -グルコシド、PMS、DCIP、及び、リン酸緩衝液(pH7.0)を含む基質溶液 $50\mu\text{L}$ を添加することにより、反応液量を $200\mu\text{L}$ とし、且つ、メチル α -グルコシド、PMS、DCIP及びリン酸緩衝液の終濃度をそれぞれ 10mM 、 1mM 、 $60\mu\text{M}$ 及び 50mM になるように調製し酵素反応液とした。酵素反応はpH7.0、 30°C 、暗所で10分間行い、経時的に波長 660nm の吸光度をプレートリーダーにて測定した。なお、グルコシド3-脱水素酵素の活性1単位は、上記条件下で1分間に $1\mu\text{mol}$ の基質を酸化する活性と定義した。

[0082] トレハロース、フェリシアン化カリウム、及びリン酸緩衝液(pH7.0)の終濃度が、それぞれ 40mM 、 100mM 、及び 250mM 、上記で得た粗酵素液がトレハロース 1g 当たり18単位となるように調製した反応液 390mL を 27°C 、8時間反応させた。得られた反応液に 910mL のエタノールを添加し、 $10,000\text{rpm}$ で遠心分離した。遠心上清をエバポレーターにて減圧下で 60mL に濃縮し、得られた濃縮液を $0.22\mu\text{m}$ メ

ンブランフィルターにてろ過した後、実験1-1と同じ条件による分取HPLCを繰り返して、原料トレハロースから新たに生成した糖質のピーク画分を分取し、濃縮した。次いで、下記条件で分取を繰り返して、原料トレハロースから新たに生成した糖質のピーク画分を分取し、濃縮し、凍結乾燥にて粉末化し、標品4.3gを得た。得られた標品の純度をHPLCにより分析したところ、98.1%であった。標品の一部を実験1-1で3-ケトトレハロースについて行ったと同様の手法により分析したところ、得られた標品が3,3'-ジケトトレハロースであることが判明した。

[0083] (分取HPLC条件)

カラム：Shodex SUGAR KS-801

(内径8.0mm、長さ300mm、昭和電工株式会社製)

溶離液：超純水

流速：0.4mL/分

カラム温度：75℃

検出：示差屈折計

[0084] <実験1-9：メチル α -3-ケトグルコシドの調製>

メチル α -グルコシド、フェリシアン化カリウム、及びリン酸緩衝液(pH7.0)の終濃度が、それぞれ40mM、100mM、及び250mM、実験1-8と同様の手法で調製した粗酵素液がメチル α -グルコシド1g当たり8.1単位となるように調製した反応液240mLを、室温にて2時間反応させた。得られた反応液に560mLのエタノールを添加し、10,000rpmで遠心分離した。遠心上清をエバポレーターにて減圧下で40mLに濃縮し、得られた濃縮液を0.22 μ mメンブランフィルターにてろ過した後、実験1-1と同じ条件による分取HPLCを繰り返して、原料メチル α -グルコシドから新たに生成した糖質のピーク画分を分取し、濃縮し、凍結乾燥にて粉末化し、標品0.9gを得た。得られた標品の純度をHPLCにより分析したところ、98.1%であった。標品の一部を実験1-1で3-ケトトレハロースについて行ったと同様の手法により分析したところ、

得られた標品がメチル α -3-ケトグルコシドであることが判明した。

[0085] <実験2：2-ケトグルコース及び2-ケトトレハロースの調製>

ピラノース2-オキシダーゼを用いた酵素法によりD-グルコースから2-ケトグルコースを調製するとともに、得られた2-ケトグルコースを受容体とし、 β -グルコース-1-リン酸（以下、「 β -G1P」と略称する。）をグルコシル供与体としたトレハロースホスホリラーゼの糖転移反応により2-ケトトレハロースを調製した。

[0086] <実験2-1：2-ケトグルコースの調製>

D-グルコースを50 mM酢酸緩衝液（pH 5.5）に終濃度3%（w/v）になるように溶解した基質溶液100 mLに、基質1 g当たり31単位のピラノース2-オキシダーゼ（カワラタケ（*Trametes* sp.）由来、シグマアルドリッチジャパン社販売）、及び、基質1 g当たり2,700単位のカタラーゼ（牛肝臓由来、和光純薬工業株式会社販売）を添加し、240 rpmで振とうしながら、27°Cで24時間反応させた。なお、カタラーゼを併用した理由は、ピラノース2-オキシダーゼがD-グルコースに作用し2-ケトグルコースを生成する反応過程で過酸化水素が生成するため、酵素を失活させる懸念がある過酸化水素を分解するためである。酵素反応後、得られた反応液を100°Cで10分間加熱することにより酵素を失活させた。得られた反応液における2-ケトグルコースの純度をHPLCにより分析したところ、96.4%であった。なお、得られた標品が2-ケトグルコースであることは、市販の2-ケトグルコース標準品（試薬、シグマアルドリッチジャパン社販売）とHPLC分析におけるクロマトグラムを比較することにより確認した。最終的に3 gのD-グルコースから2.86 gの2-ケトグルコースが得られた。

[0087] <実験2-2：2-ケトトレハロースの調製>

実験2-1の方法で得た2-ケトグルコース含有反応液に β -G1P（林原調製品）、50 mM酢酸緩衝液（pH 5.5）を添加し、2-ケトグルコースの終濃度を1%（w/v）、 β -G1Pの終濃度を10%となるように

調整した基質溶液200 mLに、 β -G1P 1 g当たり10単位（2-ケトグルコース当たり100単位）のトレハロースホスホリラーゼ（サーモアナエロバクター由来、林原調製品）を添加し40°Cで24時間反応させた。酵素反応後、得られた反応液を100°Cで10分間加熱することにより酵素を失活させた。反応液をLC/MS分析に供し、分子量がトレハロースより2小さい2-ケトトレハロースの生成を確認した。反応液中の2-ケトトレハロース含量は0.37 gであった。得られた反応液を脱塩した後、実験1-1で行ったと同じ条件で分取HPLCを行い、2-ケトトレハロース画分を回収し、実験1-1で行ったと同じ分析条件で2-ケトトレハロースの純度を測定したところ、95.0%であった。最終的に2 gの2-ケトグルコースを用いて0.36 gの2-ケトトレハロースが得られた。

[0088] <実験3：ヒト単球性細胞のTNF- α 産生に及ぼす3-ケト糖又は2-ケト糖の影響>

ヒト単球性細胞株であるTHP-1細胞は、リポポリサッカライド（LPS）とインターフェロン- γ （IFN- γ ）で刺激すると大量のTNF- α を産生する。そこで、この実験系を用いて3-ケト糖又は2-ケト糖がTNF- α 産生に及ぼす影響を検討した。

[0089] 本実験で用いたTHP-1細胞は、細胞分化誘導剤としても知られている酪酸ナトリウムで処理するとLPSに対する応答性が高まることが報告されていることから、予め2 mMの酪酸ナトリウムで4~5日間培養したものを用いた。酪酸ナトリウム処理したTHP-1細胞を、10%ウシ胎児血清含有RPMI 1640培地を用い 1×10^6 個/mLの細胞濃度に調製したものを96ウェルマイクロプレートに0.1 mL添加した。次に同培地に実験1で得た3-ケトトレハロース、3-ケトラクトース、3-ケトコージビオース、3-ケトイソマルトース、3-ケトマルトース、3-ケトスクロース、3-ケトマルチトール、3,3'-ジケトトレハロース、メチル α -3-ケトグルコシド、実験2で得た2-ケトグルコース、2-ケトトレハロースをウェル当たり0.05 mL添加して、表1に示す各終濃度になるよう調整し

、37℃で2～3時間インキュベーションした。その後、同培地に、12.5 μg/mLの濃度に調製したLPSと1,250 IU/mLの濃度に調製したヒトIFN-γを混合した培地を、ウェル当たり0.1 mL添加してTHP-1細胞を刺激した。THP-1細胞を37℃で18時間培養した後に、培養上清中のTNF-α産生量を特異的ELISA（酵素結合免疫測定）法により測定した。なお、TNF-α産生量は、被験物質無添加の対照における培養上清中のTNF-α産生量を100%として、下記計算式により相対評価した。また、従来から抗炎症剤として知られているグリチルリチン酸ジカリウム（GK2）の作用と比較した。

[0090] [数1]

$$\text{相対TNF-}\alpha\text{産生量 (\%)} = \frac{\text{被験物質添加における培養上清中のTNF-}\alpha\text{産生量}}{\text{対照における培養上清中のTNF-}\alpha\text{産生量}} \times 100$$

[0091] THP-1細胞のTNF-α産生に及ぼす3-ケト糖又は2-ケト糖の影響を表1に示す。実験は3回行い、対照に対してダネットの多重比較検定を行なった。表1に3回の実験の平均値を示し、危険率 $p < 0.01$ の場合を有意差ありと判定し、*で示した。

[0092]

[表1]

被験試料	濃度 (mM)	相対TNF- α 産生量 (%)
無添加(対照)	-	100
グリチルリチン酸 ジカリウム(GK2)	0.5	78.7*
	1.0	53.3*
	2.0	17.4*
3-ケトトレハロース	0.5	61.3*
	1.0	44.1*
	2.0	31.4*
3-ケトラクトース	0.5	72.0*
	1.0	67.2*
	2.0	48.7*
3-ケトコージピオース	0.5	65.8*
	1.0	54.2*
	2.0	42.0*
3-ケトイソマルトース	0.5	79.7*
	1.0	75.9*
	2.0	66.3*
3-ケトマルトース	0.5	67.7*
	1.0	64.6*
	2.0	46.4*
3-ケトスクロース	0.5	87.8*
	1.0	84.2*
	2.0	77.0*
3-ケトマルチトール	0.5	61.6*
	1.0	47.3*
	2.0	31.2*
3, 3'-ジケトトレハロース	0.25	32.9*
	0.5	13.4*
	1.0	2.3*
	2.0	1.5*
メチル- α - 3-ケトグルコシド	2.0	94.1
	4.0	89.9
	8.0	79.7*
	16.0	49.5*
2-ケトグルコース	0.5	96.4
	1.0	93.6
	2.0	69.0*
	4.0	53.8*
2-ケトトレハロース	0.5	69.6*
	1.0	60.6*
	2.0	41.3*

[0093] 表1から明らかなように、抗炎症剤として知られているGK2は、濃度依存的にTHP-1細胞のTNF- α 産生を抑制し、1.0mMで対照の53

、3%、2.0 mMで17.4%まで抑制した。一方、3-ケト二糖である3-ケトトレハロース、3-ケトラクトース、3-ケトコージビオース、3-ケトイソマルトース、3-ケトマルトース、3-ケトスクロース、3-ケトマルチトール及び3,3'-ジケトトレハロースも、0.5 mM乃至2.0 mMの濃度範囲で、いずれもTHP-1細胞のTNF- α 産生を対照の1.5~87.8%まで抑制し、その抑制はいずれも濃度依存的で、且つ、有意なものであった。

[0094] 3-ケト単糖の誘導体であるメチル α -3-ケトグルコシドは、TNF- α 産生抑制作用が弱く、4.0 mMでも有意な抑制を示さなかったものの、8.0 mMで79.7%、16.0 mMで49.5%まで抑制した。一方、2-ケトグルコースは2.0 mMで69.0%、4.0 mMで53.8%までTNF- α の産生を抑制し、2-ケトトレハロースは0.5乃至2.0 mMの濃度範囲で69.6~41.3%まで抑制した。

[0095] なお、本実験においては、各被験試料の各濃度において細胞数についても同時に測定したところ、3-ケト糖である3-ケトトレハロース、3-ケトラクトース、3-ケトコージビオース、3-ケトイソマルトース、3-ケトマルトース、3-ケトスクロース、3-ケトマルチトール及びメチル α -3-ケトグルコシド、2-ケト糖である2-ケトグルコース及び2-ケトトレハロースは、いずれの濃度で用いた場合も、細胞数はほぼ対照と同等であり、これらの3-ケト糖又は2-ケト糖の添加によりTHP-1細胞の生細胞数は低下しないことが確認された。なお、3,3'-ジケトトレハロースの場合には、1.0~2.0 mMの濃度ではわずかに生細胞数が低下したものの、生細胞数を低下させない0.25 mMの低濃度においてもTNF- α の産生抑制作用が認められた。

[0096] 本実験の結果は、3-ケト糖である3-ケトトレハロース、3-ケトラクトース、3-ケトコージビオース、3-ケトイソマルトース、3-ケトマルトース、3-ケトスクロース、3-ケトマルチトール、3,3'-ジケトトレハロース及びメチル α -3-ケトグルコシド、及び、2-ケト糖である2

ーケトグルコース、2ーケトトレハロースはいずれも炎症性サイトカインであるTNF- α の産生を抑制し、抗炎症剤の有効成分として有用であることを物語っている。THP-1細胞が分泌する炎症性サイトカインTNF- α は、糖尿病、慢性呼吸器疾患、慢性関節リュウマチ、胃炎、炎症性腸疾患、アテローム性動脈硬化症、心血管障害、ニキビ、アトピー性皮膚炎、神経変性疾患などにおいてその病態形成に深く関与していることがわかっており、本実験の結果は、これらの疾患を含む幅広い炎症に対する抗炎症剤の有効成分として、3ーケト糖又は2ーケト糖が利用できることを示している。

[0097] <比較実験1：ヒト単球性細胞のTNF- α 産生に及ぼす原料糖質の影響>

上記で用いた3ーケト糖の原料糖質、すなわち、トレハロース、ラクトース、コージビオース、イソマルトース、マルトース、スクロース、マルチトール、メチル- α -グルコシドに加えて、非特許文献1において抗炎症作用を有することが報告されているD-プシコースを被験試料とし、実験3で用いた実験系を用いTNF- α 産生抑制作用を同様に調べた。なお、培地中の各被験試料の濃度を、トレハロース、ラクトース、コージビオース、イソマルトース、マルトース、スクロース、マルチトールについては、4.8mM、19.2mM及び57.2mM、メチル- α -グルコシド、D-プシコースについては、4.8mM、14.4mM及び43.2mMの三段階とした。

[0098] THP-1細胞のTNF- α 産生に及ぼす3ーケト糖の原料糖質及びD-プシコースの影響を表2に示す。実験は3回行い、対照に対してダネットの多重比較検定を行なった。表2に実験3回の平均値を示し、危険率 $p < 0.01$ の場合を有意差ありと判定し、*で示した。

[0099]

[表2]

被験試料	濃度 (mM)	相対TNF- α 産生量 (%)
無添加(対照)	-	100
トレハロース	4.8	98.6
	19.2	104
	57.6	76.7*
ラクトース	4.8	105
	19.2	105
	57.6	76.5*
コージビオース	4.8	95.5
	19.2	93.5
	57.6	70.2*
イソマルトース	4.8	96.9
	19.2	108
	57.6	103
マルトース	4.8	102
	19.2	115
	57.6	83.2*
スクロース	4.8	108
	19.2	106
	57.6	68.5*
マルチトール	4.8	95.6
	14.4	100
	43.2	90.1*
メチル- α -グルコシド	4.8	100
	14.4	89.0
	43.2	76.5*
D-ブシコース	4.8	109
	14.4	92.7
	43.2	67.4*

[0100] 表2から明らかなように、トレハロース、ラクトース、コージビオース、マルトース、スクロース、マルチトールは濃度を57.6 mM又は43.2 mMまで高めた場合にはじめてTNF- α 産生抑制作用を示したものの、イソマルトースは57.6 mMの濃度でも作用を示さなかった。3-ケト二糖がいずれも2 mM以下の濃度でTNF- α 産生抑制作用を示した上記表1の結果と比べると、これら原料二糖の作用はごく弱く、少なくとも50倍以上の濃度を用いなければ、同様のTNF- α 産生抑制作用を示さないことが分かった。一方、抗炎症作用が報告されているD-ブシコース、さらにメチル- α -グルコシドは43.2 mMの濃度でTNF- α 産生抑制作用を示した

。しかしながら、D-プシコース及びメチル- α -グルコシドの作用は3-ケト二糖である3-ケトトレハロース、3-ケトラクトース、3-ケトコージビオース、3-ケトイソマルトース、3-ケトマルトース、3-ケトスクロース、3-ケトマルチトール、3,3'-ジケトトレハロースの作用、及び、2-ケト糖である2-ケトグルコース、2-ケトトレハロースの作用に比べ弱いものであった。

[0101] これらの結果から、分子内にアルドヘキソース構造を有する糖質において、そのアルドヘキソース構造における3位水酸基又は2位水酸基をケト基に変換することによりアルドヘキソース構造を有する糖質の抗炎症作用を顕著に向上させることができることが明らかとなった。

[0102] <実験4：ヒト皮膚線維芽細胞のIL-8産生に及ぼす3-ケト糖の影響>
炎症性サイトカインであるIL-8の産生に及ぼす3-ケト糖の影響をヒト正常皮膚線維芽細胞（NHDF細胞）について調べた。

[0103] 96ウェルマイクロプレートに、10%ウシ胎児血清含有ダルベッコ変法イーグル培地を用いて、 1×10^5 個/mLの濃度に調製したNHDF細胞を0.2 mL添加し、ウェルの底面全体を占める状態まで培養した。培養上清を吸引除去した後、新鮮な10%ウシ胎児血清含有ダルベッコ変法イーグル培地をウェル当り0.1 mL添加した。次に同培地で適宜希釈した3-ケトトレハロース、3-ケトラクトース、3-ケトコージビオース又は3-ケトイソマルトースを0.05 mL添加し、終濃度が表3に示す濃度になるよう調整し37°Cで24時間培養し、これにIL-8の産生を刺激するヒトIL-1 β を終濃度1 ng/mLとなるように添加してさらに24時間培養した。比較のため、抗炎症剤として知られているGK2についても同様に行った。

[0104] 培養上清中のIL-8量は特異的ELISAキット（アフィメトリックス社製）を用いて検出し、テトラメチルベンジジンで発色させた後、450 nmの吸光度を測定した。被験試料を添加しない以外は同様に処理したものを対照とし、対照における培養上清中のIL-8産生量を100%として、下

記計算式により、IL-8産生量を相対評価した。

[0105] [数2]

$$\text{相対IL-8産生量 (\%)} = \frac{\text{被験物質添加における培養上清中のIL-8産生量}}{\text{対照における培養上清中のIL-8産生量}} \times 100$$

[0106] NHDF細胞のIL-8産生に及ぼす3-ケト糖の影響を表3に示す。なお、実験は3回行い、対照に対してダネットの多重比較検定を行なった。表3に3回の実験の平均値を示し、危険率 $p < 0.01$ の場合を有意差ありと判定し、*で示した。

[0107] [表3]

被験試料	濃度 (mM)	相対IL-8産生量 (%)
無添加(対照)	-	100
グリチルリチン酸 ジカリウム(GK2)	0.5	108
	1.0	107
	3.0	36.0*
3-ケトトレハロース	0.5	89.9
	1.0	78.8*
	3.0	52.5*
3-ケトラクトース	0.5	87.1
	1.0	87.8
	3.0	78.4*
3-ケトコージビオース	0.5	89.1
	1.0	89.2
	3.0	74.0*
3-ケトイソマルトース	0.5	86.2
	1.0	110
	3.0	82.0

[0108] 表3から明らかなように、対照と比較して、3-ケトトレハロース、3-ケトラクトース、3-ケトコージビオース及び3-ケトイソマルトースでは、試験した濃度範囲においてIL-8産生抑制作用が認められた。なお、IL-8産生抑制作用が認められた濃度では、3-ケトトレハロースの3.0 mMでわずかに細胞数の減少が認められた以外は、細胞数に影響は認められなかったことから、3-ケト糖によるIL-8産生抑制は細胞自体の障害作

用によるものではないことが確認された。また、GK 2は3.0 mMでは対照に対してIL-8産生の有意な抑制が認められたものの、0.5 mM及び1.0 mMでは逆にIL-8産生の増加が認められた。

[0109] 本実験の結果は、3-ケト糖である3-ケトトレハロース、3-ケトラクトース、3-ケトコージビオース及び3-ケトイソマルトースはいずれも炎症性サイトカインであるIL-8の産生を抑制し、抗炎症剤の有効成分として有用であることを物語っている。より具体的には、3-ケト糖がヒト正常皮膚線維芽細胞からのIL-8産生を抑制したことから、アレルギー性皮膚炎、アトピー性皮膚炎、ニキビ、乾癬などの皮膚の炎症症状の緩和、改善に加え、各種炎症性疾患の予防、治療に有用であることを物語っている。

[0110] <実験5：ヒト表皮ケラチノサイト細胞（NHEK細胞）のIL-8産生に及ぼす3-ケト糖の影響>

炎症性サイトカインであるIL-8の産生に及ぼす3-ケト糖の影響をヒト表皮ケラチノサイト細胞（NHEK細胞）について調べた。

[0111] コラーゲンコートした96ウェルマイクロプレートに、増殖因子含有ケラチノサイト用培地（商品名「EpiLife」，ライフテクノロジーズ社製）を用いて、 5.0×10^4 個/mLの濃度に調製した正常NHEK細胞を0.2 mL添加し、1～2日おきに培地を交換しながら37℃で3日間培養した。その後、増殖因子を含有しないケラチノサイト用培地に交換し、さらに24時間培養することにより細胞を調製した。培養上清を吸引除去した後、増殖因子を含有しないケラチノサイト用培地で、適宜希釈した3-ケトトレハロース、3-ケトラクトース、3-ケトコージビオース又は3-ケトイソマルトースをウェル当たり0.2 mL添加し、終濃度が表4に示す濃度になるよう調整し37℃で24時間培養し、これにIL-8の産生を刺激するヒトTNF- α を終濃度10 ng/mL、ヒトIFN- γ を100 IU/mLとなるようにウェル当たり0.05 mL添加し、さらに18～20時間培養した。比較のため、抗炎症剤として知られているGK 2についても同様に行った。

[0112] 培養上清中のIL-8量は特異的ELISAキット（アフメトリックス社製）を用いて検出し、テトラメチルベンジジンで発色させた後、450nmの吸光度を測定した。被験試料を添加しない以外は同様に処理したものを対照とし、実験4と同様にIL-8産生量を相対評価した。

[0113] NHEK細胞のIL-8産生に及ぼす3-ケト糖の影響を表4に示す。なお、実験は3回行い、対照に対してダネットの多重比較検定を行なった。表4に3回の実験の平均値を示し、危険率 $p < 0.01$ の場合を有意差ありと判定し、*で示した。

[0114] [表4]

被験試料	濃度 (mM)	相対IL-8産生量 (%)
無添加(対照)	-	100
グリチルリチン酸 ジカリウム(GK2)	0.5	71.6*
	1.0	57.6*
	3.0	161*
3-ケトトレハロース	0.5	80.7*
	1.0	79.0*
	3.0	58.9*
3-ケトラクトース	0.5	87.3
	1.0	85.2
	3.0	67.4*
3-ケトコージピオース	0.5	89.4
	1.0	86.7
	3.0	76.3*
3-ケトイソマルトース	0.5	78.6*
	1.0	81.9*
	3.0	82.4

[0115] 表4から明らかのように、対照と比較して、3-ケトトレハロース、3-ケトラクトース、3-ケトコージピオース及び3-ケトイソマルトースでは、試験した濃度範囲においてIL-8産生抑制作用が認められた。また、IL-8産生抑制作用が認められた濃度では、3-ケトトレハロースの3.0mMでわずかな細胞数の減少が認められた以外は、細胞数に影響は認められなかったことから、3-ケト糖によるIL-8産生抑制は細胞の障害作用に

よるものではないことが確認された。また、GK 2は0.5 mM及び1.0 mMでは対照に対してIL-8産生の有意な抑制が認められたものの、逆に3.0 mMでは有意なIL-8産生の増加が認められた。

[0116] 本実験の結果は、3-ケト糖である3-ケトトレハロース、3-ケトラクトース、3-ケトコージビオース及び3-ケトイソマルトースはいずれも炎症性サイトカインであるIL-8の産生を抑制し、抗炎症剤の有効成分として有用であることを物語っている。より具体的には、3-ケト糖がヒト表皮ケラチノサイト細胞からのIL-8産生を抑制したことから、アレルギー性皮膚炎、アトピー性皮膚炎、ニキビ、乾癬などの皮膚の炎症症状の緩和、改善に加え、各種炎症性疾患の予防、治療に有用であることを物語っている。

[0117] <実験6：ヒト歯肉線維芽細胞のプロスタグランジンE2及びIL-6産生に及ぼす3-ケト糖及び2-ケト糖の影響>

歯周病では歯周病原性細菌の感染により、歯周組織のマクロファージや線維芽細胞が活性化され、炎症関連サイトカインであるIL-1、IL-6、TNF- α 及びプロスタグランジンE2 (PGE2)が過剰に産生され、組織破壊を誘導していると考えられている。特に歯周病患者の歯肉組織や歯肉溝滲出液中では、PGE2レベルが健常者のそれに比べて亢進しており、実際に非ステロイド性抗炎症剤のインドメタシンやイブプロフェンを歯周炎モデルに投与すると歯周病の進行が抑制されることも報告されている(「野口和行、歯周病とプロスタグランジン、鹿歯紀要、28巻、39-48頁(2008)」。従って、活性化歯肉線維芽細胞からのPGE2やIL-6等の炎症メディエーターの産生を抑制できれば、歯周病の予防や治療に有効と考えられる。

[0118] IL-1 β 刺激による活性化ヒト歯肉線維芽細胞(HGF細胞)からのPGE2及びIL-6産生系を用いて、3-ケトトレハロース及び2-ケトグルコースがPGE2及びIL-6産生に及ぼす影響を調べ、GK2と比較した。

[0119] コラーゲンコートした96ウェルマイクロプレート(ASAHIガラス社

製)に、10%ウシ胎児血清含有ダルベッコ変法イーグル培地を用いて、 5×10^4 個/mLの濃度に調製したHGF細胞を0.2 mL添加し、ウェルの底面全体を占める状態まで培養した。培養上清を吸引除去した後、新鮮な10%ウシ胎児血清含有ダルベッコ変法イーグル培地をウェル当たり0.15 mL添加した。次に同培地で適宜希釈した3-ケトトレハロース、2-ケトグルコース又はGK2を0.05 mL添加し、37°Cで24時間培養した。その後、ヒトIL-1 β を終濃度1 ng/mLとなるように添加し、さらに24時間培養した。

[0120] 培養上清中のPGE2及びIL-6は、それぞれ特異的ELISAキット(PGE2; Enzo Lifesciences社製、IL-6; R&D社製)を用いて検出し、テトラメチルベンジジンで発色させた後、450 nmの吸光度を測定することにより定量した。被験物質を添加しない以外は同様に処理したものを対照とし、対照における培養上清中のPGE2及びIL-6を100%として、実験4でIL-8産生量について示したと同様の計算式により、PGE2及びIL-6産生量を相対評価した。なお、実験は3回行い、対照に対してダネットの多重比較検定を行なった。危険率 $p < 0.01$ を有意差ありとし、*で示した。結果を表5に示す。

[0121] [表5]

被験試料	濃度 (mM)	相対PGE2産生量 (%)	相対IL-6産生量 (%)
無添加(対照)	-	100	100
グリチルリチン酸ジカリウム(GK2)	0.25	112	-
	0.5	108	69.2
	1.0	78.6*	67.3
	2.0	12.0*	50.5*
3-ケトトレハロース	0.25	94.3	-
	0.5	81.5*	81.3
	1.0	68.5*	68.1
	2.0	52.7*	55.5*
2-ケトグルコース	0.25	111	-
	0.5	133	80.4
	1.0	108	78.1
	2.0	42.2*	58.4*

[0122] 表5から明らかのように、被験物質を添加しない対照と比較して、3-ケトトレハロースでは濃度依存的、且つ、有意なPGE₂産生抑制作用が認められた。しかも1mM以下の濃度ではGK2よりも強いPGE₂産生抑制作用が認められた。一方、2-ケトグルコースでは2mMの濃度で有意なPGE₂産生抑制作用が見られた。また、3-ケトトレハロース及び2-ケトグルコースはいずれも2mMの濃度でGK2と同程度のIL-6産生抑制作用を示した。なお、試験した濃度範囲では細胞障害作用は認められなかった。

[0123] これらの結果から、3-ケトトレハロース及び2-ケトグルコースには活性化歯肉線維芽細胞からの炎症メディエーターの産生を抑制する作用があり、歯周病の予防又は治療に有効であることが判明した。

[0124] <実験7：ヒト腸管上皮細胞株Caco-2のIL-8産生に及ぼす3-ケト糖の影響>

腸管への細菌の侵入による炎症時には、生体の防御反応として粘膜固有層のマクロファージ等から産生されたIL-1やTNF- α が上皮細胞に作用してIL-8等のケモカインが産生され、このIL-8により好中球を炎症局所に浸潤・集積させて微生物の排除にあたる。しかし炎症性腸疾患の場合のように、何らかの理由により炎症が長期化、慢性化した場合、過剰な炎症応答（例えばIL-8産生量持続的増大）の結果として浸潤した好中球による組織破壊が起こるとも報告されている。従って、IL-1やTNF- α による腸管上皮細胞からの炎症メディエーターとしてのIL-8産生を抑制することは、潰瘍性大腸炎やクローン病等の炎症性腸疾患の軽減又は治療につながると考えられることから、ヒト腸管上皮細胞からのIL-8産生に及ぼす3-ケト糖の影響を調べた。

[0125] コラーゲンコートした96ウェルマイクロプレート（IWAKIガラス社製）に、10%ウシ胎児血清含有ダルベッコ変法イーグル培地を用いて、 3×10^4 個/mLの濃度に調製したCaco-2細胞を0.2mL添加し、37°Cで3日間培養した。培養上清を吸引除去した後、新鮮な1%ウシ胎児血清含有ダルベッコ変法イーグル培地をウェル当り0.1mL添加した。次に

同培地で適宜希釈した3-ケトトレハロース、3-ケトマルチトール、又はGK2をウェル当り0.05 mL添加し、37℃で7時間インキュベーションした。インキュベーション後、同培地で2.5 ng/mLの濃度に調整したIL-1βと62.5 ng/mLの濃度に調整したTNF-αを含む培地をウェル当り0.1 mL添加して刺激した。刺激から16~18時間後に、培養上清中のIL-8産生量を、特異的ELISAキット(R&D社製)を用いて検出し、テトラメチルベンジジンで発色させた後、450 nmの吸光度を測定した。IL-8産生量は、被験物質を添加しない以外は同様に処理したものを対照とし、対照における培養上清中のIL-8産生量を100%として、実験4で用いたと同じ計算式により相対評価した。

[0126] [表6]

被験試料	濃度 (mM)	相対IL-8産生量 (%)
無添加(対照)	-	100
グリチルリチン酸ジカリウム(GK2)	0.25	98.4
	0.5	93.5
	1.0	106
	2.0	114
3-ケトトレハロース	0.25	90.9
	0.5	82.0
	1.0	75.0*
	2.0	58.3*
3-ケトマルチトール	0.25	76.9*
	0.5	73.9*
	1.0	73.7*
	2.0	59.7*

[0127] 表6から明らかなように、活性化腸管上皮細胞株Caco-2細胞において、GK2ではIL-1βとTNF-αの刺激によるIL-8産生の抑制は全く認められなかった。これに対して3-ケトトレハロース及び3-ケトマルチトールでは濃度依存的、且つ有意なIL-8産生抑制作用が認められた。

[0128] この結果は、3-ケトトレハロース及び3-ケトマルチトールが炎症性腸疾患の予防又は治療効果を有することを示している。

[0129] <実験8：3-ケト糖による前処理がヒト皮膚線維芽細胞の酸化障害への耐

性に及ぼす影響>

正常ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF細胞）を用い、ヒト皮膚線維芽細胞の酸化障害に対する耐性に及ぼす3-ケト糖の影響、詳細には、細胞の3-ケト糖存在下での前処理が活性酸素種の1つである過酸化水素で処理したときに生じる細胞障害に及ぼす影響を調べた。

[0130] 96ウェルマイクロプレートに、10%ウシ胎児血清含有ダルベッコ変法イーグル培地を用いて、 1×10^5 個/mLの濃度に調製したNHDF細胞を0.2 mL添加し、ウェルの底面全体を占める状態まで培養した。培養上清を吸引除去した後、新鮮な10%ウシ胎児血清含有ダルベッコ変法イーグル培地をウェル当り0.1 mL添加した。次に同培地で適宜希釈した3-ケトトレハロース、3-ケトラクトース、3-ケトコージビオース又は3-ケトイソマルトースを0.1 mL添加し、37°Cで24時間培養した。比較のため、抗炎症剤として知られているGK2についても同様に行った。

[0131] 培養後、培養上清を吸引除去した後、HANKS緩衝液にて150 μ Mの濃度に調製した過酸化水素をウェル当り0.2 mL添加し、37°Cで2時間インキュベーションした。次いで、過酸化水素溶液を吸引除去し、10%ウシ胎児血清含有ダルベッコ変法イーグル培地をウェル当り0.2 mL添加した後、さらに37°Cで48時間培養した。

[0132] 培養後の細胞数は、セルカウンティングキット（株式会社同人化学研究所製）を用いて測定した。すなわち、48時間培養した細胞の培養上清を吸引除去した後、新鮮な10%ウシ胎児血清含有ダルベッコ変法イーグル培地をウェル当り0.1 mL添加し、さらに同培地にて10倍希釈したセルカウンティングキットをウェル当り0.1 mL添加して37°Cで2時間インキュベーションした。最後に、細胞数に対応する450 nmの吸光度を分光光度計にて測定した。被験物質（3-ケト糖）での前処理を行わない以外は同様に過酸化水素処理した細胞を対照とし、対照における吸光度を100%として、下記計算式により細胞数を相対細胞数として評価した。

[0133]

[数3]

$$\text{相対細胞数 (\%)} = \frac{\text{被験物質で前処理したものの吸光度}}{\text{対照の吸光度}} \times 100$$

[0134] 3-ケト糖存在下での前処理が過酸化水素で処理したときに生じるヒト皮膚線維芽細胞の細胞障害への耐性に及ぼす影響を表5に示した。なお、実験は3回行い、対照に対してダネットの多重比較検定を行なった。表7に3回の実験の平均値を示し、危険率 $p < 0.01$ の場合を有意差ありと判定し、*で示した。

[0135] [表7]

被験試料	濃度 (mM)	相対細胞数 (%)
過酸化水素処理(対照)	-	100
グリチルリチン酸 ジカリウム(GK2)	1.0	76.2
	3.0	101
3-ケトトレハロース	1.0	134
	3.0	194*
3-ケトラクトース	1.0	107
	3.0	147*
3-ケトコージビオース	1.0	118
	3.0	164*
3-ケトイソマルトース	1.0	118
	3.0	124

[0136] 表7から明らかなように、3-ケトトレハロース、3-ケトラクトース、3-ケトコージビオース及び3-ケトイソマルトースで前処理したヒト皮膚線維芽細胞は、対照と比較して、試験した濃度範囲において濃度依存的且つ有意に細胞数が多かったことから、3-ケト糖がヒト皮膚線維芽細胞の過酸化水素による細胞障害に対する耐性を賦与する作用を有することが判明した。なお、GK2にはそのような作用は認められなかった。

[0137] 本実験結果は、3-ケト糖である3-ケトトレハロース、3-ケトラクトース、3-ケトコージビオース及び3-ケトイソマルトースは、いずれも活性酸素種による細胞障害への耐性をヒト皮膚線維芽細胞に賦与する効果があ

り、活性酸素種を原因とする炎症に対する抗炎症剤の有効成分として有用であることを物語っている。より具体的には、活性酸素種の関与が報告されている手術侵襲、虚血再灌流障害、潰瘍性大腸炎、さらには、アトピー性皮膚炎などの皮膚炎症疾患や紫外線暴露による皮膚の老化の予防乃至治療に有用であることを物語っている。

[0138] 実験3乃至8の結果から、3-ケト糖又は2-ケト糖などの分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質は、細胞に悪影響を与えることなく、炎症性サイトカインであるTNF- α 、IL-8、PGE2、IL-6などの産生を抑制し、また、3-ケト糖は活性酸素種による細胞障害を予防する作用も有していることから、これら3-ケト糖及び2-ケト糖は抗炎症剤の有効成分として用いることができることが判明した。また、分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質を有効成分とする本発明の抗炎症剤は、GK2と比較すると、低濃度で炎症性サイトカインの産生を抑制し、抗酸化作用を有するためより効果的で、且つ、副作用の懸念が少ない安全な抗炎症剤と言える。

[0139] 次に実施例を挙げて、本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例に何ら限定されるものではない。

実施例 1

[0140] <抗炎症剤>

下記組成を混合し、定法により0.5gずつ打錠して、経口用抗炎症剤を調製した。

(組成)	(質量%)
3-ケトトレハロース	10.0
トレハロース	90.0
ステアリン酸マグネシウム	0.2

[0141] 本品は、抗炎症作用の有効成分として3-ケトトレハロースを含有しているので、敗血症、慢性関節リウマチ、ARDS、肝炎、炎症性腸疾患、活性酸素が関与する疾患等を改善できる経口用抗炎症剤である。

実施例 2

[0142] <クレンジングクリーム>

下記組成のクレンジングクリームを常法により調製した。

(組成)	(質量%)
ステアリン酸	2.0
ステアリルアルコール	3.0
親油型モノステアリン酸グリセリル	2.0
ミツロウ	1.5
ワセリン	6.0
流動パラフィン	40.0
ジメチルポリシロキサン (100CS)	0.5
セスキオレイン酸ソルビタン	1.0
防腐剤	適量
トリエタノールアミン	1.0
プロピレングリコール	10.0
ポリエチレングリコール20000	0.5
カルボキシビニルポリマー	0.05
精製水	残量
3-ケトトレハロース5% (w/v) 水溶液	1.0
香料	適量

[0143] 本品は、3-ケトトレハロースが配合されているので、ヒト皮膚における真皮の線維芽細胞、表皮のケラチノサイトにおいて炎症性サイトカインの産生を抑制し、皮膚の炎症を抑制、改善することができる。また、本品は、皮膚を滑らかにするクレンジングクリームであり、軽やかな伸び広がりメイクの汚れ落ちもよい。

実施例 3

[0144] <洗顔料>

下記組成の洗顔料を常法により調製した。

(組成)	(質量%)
ラウリン酸	5.0
ミリスチン酸	18.5
ステアリン酸	6.0
グリセリン	12.0
ポリエチレングリコール1500	5.0
水酸化カリウム	6.5
精製水	残量
ヤシ油脂肪酸ジエタノールアミド	5.0
ヤシ油脂肪酸メチルタウリンナトリウム	1.8
ポリオキシエチレンラウリルエーテル(7.5E.O.)	2.0
ジステアリン酸エチレングリコールラウリルエーテル	1.0
ヒドロキシプロピルメチルセルロース1%(w/v)水溶液	5.0
3-ケトラクトース5%(w/v)水溶液	2.0
香料	適量

[0145] 本品は、3-ケトラクトースが配合されているので、ヒト皮膚における真皮の線維芽細胞、表皮のケラチノサイトにおいて炎症性サイトカインの産生を抑制し、皮膚の炎症を抑制、改善することができる。また、本品は、皮膚をキメ細やかに保つ洗顔料であり、豊かな泡立ちとさっぱりとした使用感を奏する。

実施例 4

[0146] <パック>

下記組成のパックを常法により調製した。

(組成)	(質量%)
ポリビニルアルコール	15.0
ポリエチレングリコール	3.0
プロピレングリコール	7.0
エタノール	10.0

ローヤルゼリーエキス	1.0
3-ケトコージビオース	0.5
防腐剤	適量
香料	適量
精製水	残量

[0147] 本品は、3-ケトコージビオースが配合されているので、ヒト皮膚における真皮の線維芽細胞、表皮のケラチノサイトにおいて炎症性サイトカインの産生を抑制し、皮膚の炎症を抑制、改善することができる。本品は、その典型的な使用態様により、皮膚の炎症を改善し、皮膚の状態を良好に維持することができるパックであり、美白効果にも優れている。

実施例 5

[0148] <日焼け止め用ゲルクリーム>

下記組成の日焼け止め用ゲルクリームを常法により調製した。

配合成分	(質量%)
パラメトキシケイ皮酸オクチル	4.0
オキシベンゾン	3.0
流動パラフィン	16.0
オリーブ油	9.0
ジブチルヒドロキシルエン	0.01
3-ケトイソマルトース	1.0
アクリル酸/メタクリル酸アルキル共重合体	0.6
カルボキシビニルポリマー	0.4
アスコルビン酸2-グルコシド	2.0
アラントイン	1.0
トリエタノールアミン	1.0
防腐剤	適量
精製水	残量

[0149] 本品は、3-ケトイソマルトースが配合されているので、ヒト皮膚におけ

る真皮の線維芽細胞、表皮のケラチノサイトにおいて炎症性サイトカインの産生を抑制し、皮膚の炎症を抑制、改善することができる。また、本品は、3-ケトイソマルトース及びアラントインの持つ抗炎症作用により、日焼けを抑制し、ほてりをおさめる消炎効果に優れたジェルである。

実施例 6

[0150] <乳液>

ポリオキシエチレンベヘニルエーテル0.5質量部、テトラオレイン酸ポリオキシエチレンソルビトール1質量部、親油型モノステアリン酸グリセリン1質量部、ピルビン酸0.5質量部、ベヘニルアルコール0.5質量部、アボガド油1質量部、3-ケトマルトース1質量部、ビタミンE及び防腐剤の適量を、常法に従って加熱溶解し、これにL-乳酸ナトリウム1質量部、1,3-ブチレングリコール5質量部、カルボキシビニルポリマー0.1質量部及び精製水85.3質量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて攪拌混合し乳液を製造した。

[0151] 本品は、3-ケトマルトースが配合されているので、ヒト皮膚における真皮の線維芽細胞、表皮のケラチノサイトにおいて炎症性サイトカインの産生を抑制し、皮膚の炎症を抑制、改善するとともに、皮膚の状態を良好に維持することができる。本品は、日焼け止め、しみ・そばかす防止、美肌、色白用の乳液として有利に利用できる。

実施例 7

[0152] <ジュース>

下記組成のジュースを常法により製造した。

(組成)	(質量%)
冷凍濃縮温州みかん果汁	5.0
果糖ブドウ糖液糖	11.0
クエン酸	0.2
L-アスコルビン酸	0.02
香料	0.2

色素	0.1
3-ケトラクトース	0.2
水	89.28

[0153] 本品は、3-ケトラクトースが配合されているので、歯周病や歯肉炎を予防するのに有用なジュースである。また、本品は、ビタミンC作用が強化されているため、みかんの風味が長期間劣化しにくいジュースである。

実施例 8

[0154] <グレープフルーツゼリー>

下記組成のグレープフルーツゼリーを常法により製造した。

(組成)	(質量%)
3-ケトトレハロース	6.0
安定剤	1.2
グレープフルーツ砂じょう	1.0
pH調整剤	0.9
グレープフルーツ果汁 (6倍濃縮果汁)	0.5
アスコルビン酸2-グルコシド	2.0
酵素処理ステビア	0.04
ベニバナ黄色	0.01
精製水	残量

[0155] 本品は、3-ケトトレハロースが配合されているので、歯周病や歯肉炎を予防するのに有用なグレープフルーツゼリーである。また、本品は、ビタミンC作用が強化されているため、グレープフルーツの風味が長期間劣化しにくいゼリーである。

実施例 9

[0156] <チューインガム>

ガムベース3質量部を柔らかくなるまで加熱融解し、これにトレハロース含量約50% (w/w) の粉末緑黄色野菜を7質量部加え、さらに、適量の着色料及び着香料とともに、3-ケトスクロースを固形分重量含量0.1%

になるように加えた後、常法により練り合わせ、成型し、包装して3-ケトスクロースを含有するチューインガムを得た。

[0157] 3-ケトスクロースを配合した本品は、皮膚の炎症を抑制し、歯周病や歯肉炎の予防効果に優れたチューインガムであり、テクスチャー、呈味ともに良好である。

実施例 10

[0158] <液剤>

定法により、下記の成分を混合し、膜濾過した後、滅菌したプラスチック製容器に30 mLずつ充填して液剤を得た。

(組成)	(質量%)
塩化ナトリウム	0.6
塩化カリウム	0.03
塩化カルシウム	0.02
乳酸ナトリウム	0.31
トレハロース	4.4
パラチニット	0.2
3-ケトトレハロース	0.05
精製水	残量

[0159] 3-ケトトレハロースを配合した本品は、結膜炎や炎症性疾患を治療するための点眼剤や注射剤として有用であり、ビタミン、カロリー及びミネラルの補給作用を兼備している。

実施例 11

[0160] <マウスウォッシュ>

下記組成のマウスウォッシュを常法により製造した。

(組成)	(質量%)
グリセリン	10.0
1, 3-プロパンジオール	3.0
低分子量寒天	5.0

ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油	0.2
3-ケトイソマルトース	0.5
アスコルビン酸2-グルコシド	1.0
塩化セチルピリジニウム	0.05
1-メントール	0.05
ラネキサム酸	0.05
サッカリンナトリウム	0.02
パラオキシ安息香酸メチル	0.01
香料	0.05
クエン酸	適量
水	89.28

[0161] 本品は、3-ケトイソマルトースが配合されているので、歯周病や歯肉炎の予防に優れたマウスウォッシュとして有利に利用できる。

実施例 12

[0162] <練歯磨>

下記組成の練歯磨を常法により製造した。

(組成)	(質量%)
第二リン酸カルシウム	30.0
ハイドロキシアパタイト	10.0
炭酸カルシウム	5.0
3-ケトトレハロース	30.0
ラウリル硫酸ナトリウム	1.5
モノフルオロリン酸ナトリウム	0.7
ポリオキシエチレンソルビタンラウレート	0.5
塩酸ジフェンヒドラミン	0.5
防腐剤	0.05
精製水	22.0

[0163] 本品は、3-ケトトレハロースが配合されているので、口腔内の炎症、歯

槽膿漏などによる歯茎の腫れ、炎症、出血などの予防や治療に優れた歯磨剤として有利に利用できる。

実施例 13

[0164] <ファンデーション>

下記組成のファンデーションを常法により調製した。

(組成)	(質量%)
タルク	20.0
マイカ	33.0
カオリン	7.0
ナイロンパウダー	10.0
二酸化チタン	10.0
雲母チタン	3.0
ステアリン酸亜鉛	1.0
赤酸化鉄	1.0
黄色酸化鉄	3.0
2-ケトグルコース	1.5
クチナシ黄・ベニバナ赤処理セルロース	2.0
糖転移ヘスペリジン	3.0
スクワラン	6.0
酢酸ラノリン	1.0
ミリスチン酸オクチルドデシル	2.0
香料	適量
防腐剤	適量

[0165] 本品は、2-ケトグルコースが配合されているので、皮膚の炎症を抑制し、皮膚の状態を良好に維持し、日焼け止め、しみ・そばかす防止、美肌、色白用のファンデーションとして利用することができる。また、本品は、抗酸化作用、ラジカル補足作用、エラスターゼ阻害作用、リパーゼ阻害作用等を有するクチナシ黄・ベニバナ赤を担持したセルロースパウダーを含有してい

るので、ニキビやシワの発生を抑制し、ハリがある肌を保持することができる。

産業上の利用可能性

[0166] 本発明の、分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質を有効成分として含有する抗炎症剤は、各種の炎症症状の緩和剤又は改善剤、及び、各種の炎症の予防剤又は治療剤として、化粧品、医薬部外品、食品及び医薬品の分野で利用することができる。

符号の説明

[0167] 図2において、

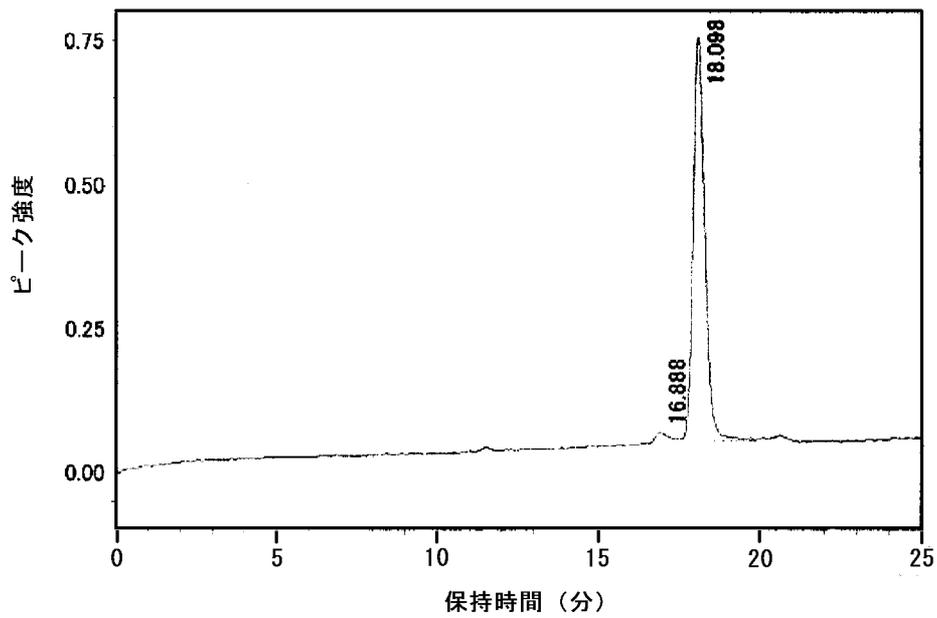
← : トレハロースの ^{13}C -NMRスペクトルに比べ低磁場側にシフトしたC-3位炭素のシグナル

請求の範囲

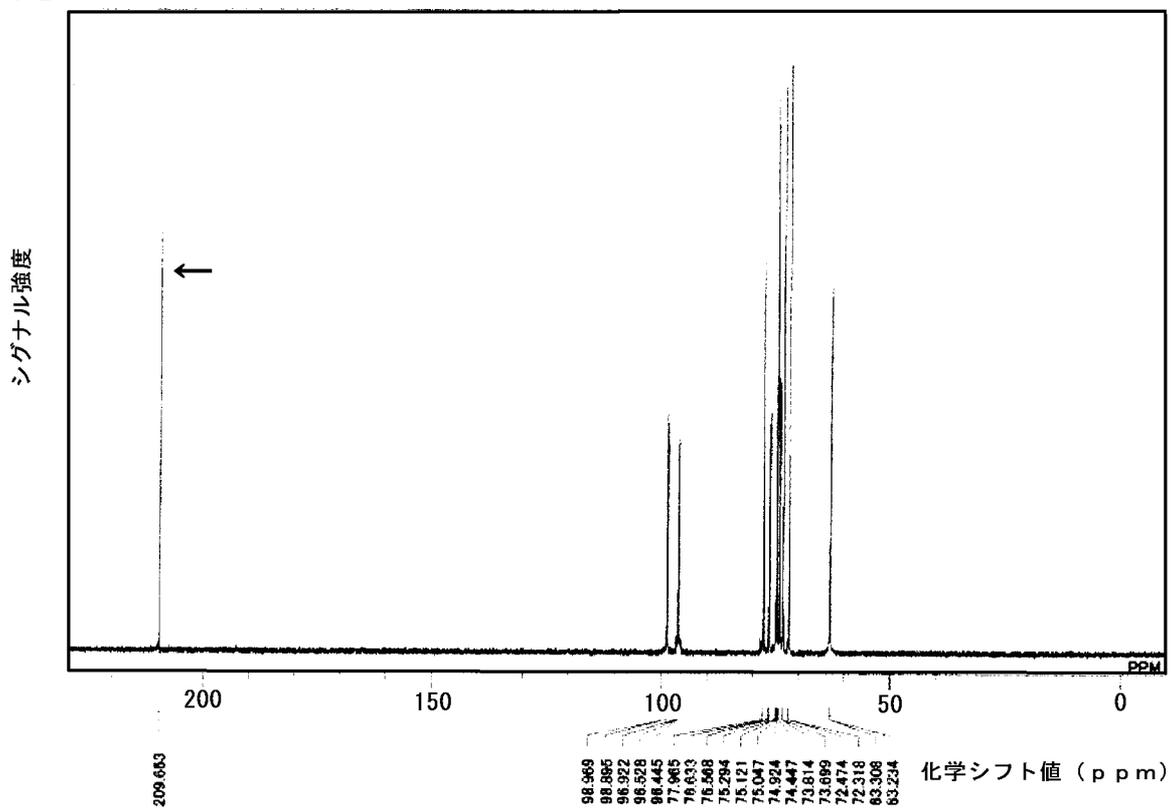
- [請求項1] 分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質を有効成分として含有する抗炎症剤。
- [請求項2] 前記ケトアルドヘキソース構造が3-ケトアルドヘキソース構造又は2-ケトアルドヘキソース構造である請求項1記載の抗炎症剤。
- [請求項3] 前記糖質が、単糖、二糖又はその糖アルコールである請求項1又は2記載の抗炎症剤。
- [請求項4] 前記糖質が、そのケトアルドヘキソース構造の1位水酸基が他の糖又は糖以外の置換基と結合している糖質であることを特徴とする請求項1乃至3のいずれかに記載の抗炎症剤。
- [請求項5] 前記3-ケトアルドヘキソース構造が、3-ケトグルコース構造又は3-ケトガラクトース構造である請求項2乃至4のいずれかに記載の抗炎症剤。
- [請求項6] 前記3-ケトアルドヘキソース構造を有する糖質が、3-ケトトレハロース、3-ケトコージビオース、3-ケトイソマルトース、3-ケトラクトース、3-ケトマルトース、3-ケトスクロース及び3-ケトマルチトールから選ばれる1種又は2種以上である請求項2乃至5のいずれかに記載の抗炎症剤。
- [請求項7] 前記2-ケトアルドヘキソース構造が、2-ケトグルコース構造である請求項2乃至4のいずれかに記載の抗炎症剤。
- [請求項8] 前記2-ケトアルドヘキソース構造を有する糖質が、2-ケトグルコース又は2-ケトトレハロースである請求項2乃至4及び7のいずれかに記載の抗炎症剤。
- [請求項9] 炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 α (TNF- α)又はインターロイキン-8 (IL-8)の産生を抑制する請求項1乃至8のいずれかに記載の抗炎症剤。
- [請求項10] 前記抗炎症剤の対象とする炎症が慢性炎症である請求項1乃至9のいずれかに記載の抗炎症剤。

- [請求項11] 慢性炎症が糖尿病、慢性呼吸器疾患、慢性関節リウマチ、胃炎、肝炎、炎症性腸疾患、神経変性疾患、心血管障害、乾癬、アトピー性皮膚炎、歯周病のいずれかである請求項10記載の抗炎症剤。
- [請求項12] 分子内にケトアルドヘキソース構造を有する糖質を0.1%乃至90%含有する請求項1乃至11のいずれかに記載の抗炎症剤。
- [請求項13] 請求項1乃至12のいずれかに記載の抗炎症剤を含有する化粧品、食品、医薬部外品又は医薬品。
- [請求項14] 分子内にアルドヘキソース構造を有する糖質において、そのアルドヘキソース構造における他の糖質又は置換基と結合していないフリーの水酸基をケト基に変換することを特徴とする、分子内にアルドヘキソース構造を有する糖質の抗炎症作用の向上方法。
- [請求項15] 前記他の糖質又は置換基と結合していないフリーの水酸基が3位水酸基又は2位水酸基である請求項14記載の方法。
- [請求項16] ケト基への変換が、酵素法又は発酵法によって行われる請求項14又は15記載の方法。
- [請求項17] 分子内にアルドヘキソース構造を有する糖質が単糖又は二糖である請求項14乃至16のいずれかに記載の方法。
- [請求項18] 前記二糖がトレハロース、コージビオース、イソマルトース、ラクトース、マルトース、スクロース及びマルチトールである請求項17記載の方法。
- [請求項19] 前記単糖がグルコースである請求項17記載の方法。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/071510

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
See extra sheet.

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)
A61K31/70, A23L33/125, A61K8/60, A61K31/7004, A61K31/7016, A61P1/02, A61P1/04, A61P1/16, A61P3/10, A61P9/00, A61P11/00, A61P17/00, A61P17/06, A61P19/02, A61P25/00, A61P29/00, A61P37/08, A61Q1/14, A61Q17/04,

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 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SUN Z. et al., "Metabolic markers and microecological characteristics of tongue coating in patients with chronic gastritis", BMC Complementary and Alternative Medicine, 2013, vol.13, No.227, p.1-10, entire text, particularly, Abstract	1-19
A	JP 2004-529958 A (Beiersdorf AG.), 30 September 2004 (30.09.2004), entire text; particularly, claims & US 2005/0002880 A1 claims & WO 2002/094211 A1 & EP 1395239 A1	1-19

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 04 October 2016 (04.10.16)	Date of mailing of the international search report 18 October 2016 (18.10.16)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/071510

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 2010-150240 A (Oppen Cosmetics Co., Ltd.), 08 July 2010 (08.07.2010), entire text; particularly, claims & JP 2012-207043 A & JP 2012-254995 A	1-19
A	JP 2007-269636 A (Kose Corp.), 18 October 2007 (18.10.2007), entire text; particularly, claims (Family: none)	1-19
A	JP 2000-093122 A (Kanebo, Ltd.), 04 April 2000 (04.04.2000), entire text; particularly, claims (Family: none)	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/071510

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

A61K31/70(2006.01)i, A23L33/125(2016.01)i, A61K8/60(2006.01)i,
A61K31/7004(2006.01)i, A61K31/7016(2006.01)i, A61P1/02(2006.01)i,
A61P1/04(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i,
A61P9/00(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i,
A61P17/06(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i,
A61P29/00(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, A61Q1/14(2006.01)i,
A61Q17/04(2006.01)i, A61Q19/00(2006.01)i, A61Q19/10(2006.01)i

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

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (International Patent Classification (IPC))

A61Q19/00, A61Q19/10

Minimum documentation searched (classification system followed by
classification symbols)

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. 特別ページ参照

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. A61K31/70, A23L33/125, A61K8/60, A61K31/7004, A61K31/7016, A61P1/02, A61P1/04, A61P1/16, A61P3/10, A61P9/00, A61P11/00, A61P17/00, A61P17/06, A61P19/02, A61P25/00, A61P29/00, A61P37/08, A61Q1/14, A61Q17/04, A61Q19/00, A61Q19/10

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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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	SUN Z. et al., "Metabolic markers and microecological characteristics of tongue coating in patients with chronic gastritis", BMC Complementary and Alternative Medicine, 2013, vol.13, No. 227, p. 1-10, 全文、特に、Abstract	1-19

☑ 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

04.10.2016

国際調査報告の発送日

18.10.2016

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）

長岡 真

4U

5277

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

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 2004-529958 A (バイヤースドルフ・アクチエンゲゼルシャフト) 2004.09.30, 全文、特に、特許請求の範囲 & US 2005/0002880 A1, claims & WO 2002/094211 A1 & EP 1395239 A1	1-19
A	JP 2010-150240 A (オープン化粧品株式会社) 2010.07.08, 全文、特に、特許請求の範囲 & JP 2012-207043 A & JP 2012-254995 A	1-19
A	JP 2007-269636 A (株式会社コーサー) 2007.10.18, 全文、特に、特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-19
A	JP 2000-093122 A (鐘紡株式会社) 2000.04.04, 全文、特に、特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-19

発明の属する分野の分類

A61K31/70(2006.01)i, A23L33/125(2016.01)i, A61K8/60(2006.01)i,
A61K31/7004(2006.01)i, A61K31/7016(2006.01)i, A61P1/02(2006.01)i,
A61P1/04(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i,
A61P11/00(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P17/06(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i,
A61P25/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, A61Q1/14(2006.01)i,
A61Q17/04(2006.01)i, A61Q19/00(2006.01)i, A61Q19/10(2006.01)i