

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4336467号
(P4336467)

(45) 発行日 平成21年9月30日(2009.9.30)

(24) 登録日 平成21年7月3日(2009.7.3)

(51) Int.Cl.

F 1

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)
G O 1 N 33/15 (2006.01)C 1 2 Q 1/02
G O 1 N 33/15 Z

請求項の数 1 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2001-317358 (P2001-317358)	(73) 特許権者	000155908
(22) 出願日	平成13年10月15日(2001.10.15)		株式会社林原生物化学研究所
(65) 公開番号	特開2003-128556 (P2003-128556A)		岡山県岡山市北区下石井1丁目2番3号
(43) 公開日	平成15年5月8日(2003.5.8)	(72) 発明者	有安 利夫
審査請求日	平成16年10月12日(2004.10.12)		岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式
			会社林原生物化学研究所内
		(72) 発明者	花谷 利春
			岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式
			会社林原生物化学研究所内
		(72) 発明者	新井 成之
			岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式
			会社林原生物化学研究所内
		(72) 発明者	池田 雅夫
			岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式
			会社林原生物化学研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し得る物質のスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

破骨細胞形成抑制因子産生能を有する F H s 7 4 I n t 細胞 (A T C C C C L 2 4 1) を栄養培地中で培養し、これに被検体を添加し、当該被検体存在下で当該培養株化細胞を培養し、次いで、培養上清中に放出された破骨細胞形成抑制因子の量を測定し、対照の測定値と対比することにより、被検体の測定値が対照の測定値を上回るか下回るとき、当該被検体が、経口又は経管投与されたとき、破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し得る物質と判定することを特徴とする、破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し得る物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤、より詳細には、糖質を有効成分とする破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤、及び破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し得る物質のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ヒトを含む哺乳動物に於ける骨芽細胞、肝臓、腎臓、肺、心臓などの臓器由来の細胞から産生されることが知られている破骨細胞形成抑制因子(オステオプロテジェリン(OPG))は、重要な骨吸収抑制因子として、近年、注目されている。その遺伝子は、シモネッ

ト・ダブリュー・エス等により、『セル』、第89巻、309乃至319頁(1997年)に於いて報告され、その研究は急速に進みつつある。この破骨細胞形成抑制因子は、血中にも存在し、骨代謝に対して、全身性で作用して破骨細胞形成を抑制すると言われている。したがって、破骨細胞の形成が異常な状態にある、ヒトを含む哺乳動物を正常化する手段として、そのような状態にある哺乳動物の破骨細胞形成抑制因子の産生量を調節することができれば、破骨細胞の形成を正常な状態に保ち、骨を健康な状態に維持することができることとなる。

【0003】

しかしながら、そのような破骨細胞形成抑制因子の産生量の調節に関する報告は殆どない。斯かる状況下、破骨細胞形成抑制因子の産生量を調節し得ると共に、病院、療養所以外の一般家庭に於いて、安全かつ手軽に日常的に常用できる薬剤の確立が鶴首されている。

10

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

斯かる状況に鑑み、本発明の第一の課題は、破骨細胞形成抑制因子の産生量を調節し得ると共に、病院、療養所以外の一般家庭に於いて、安全かつ手軽に日常的に常用できる破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤を確立することにある。また、本発明の第二の課題は、そのような産生調節剤の有効成分として配合し得る物質を迅速、簡便かつ正確にスクリーニングする方法を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

20

本発明者等は、糖質、殊に、非還元性二糖類である α 、 α -トレハロース、 α 、 β -トレハロース及び β 、 β -トレハロース(本発明に於いては、特に断りがない限り、これらトレハロースを単に、『トレハロース』と言う。)の薬理作用について鋭意研究する中、ヒト小腸粘膜上皮細胞をトレハロース存在下で培養すると、破骨細胞形成抑制因子(オステオプロテジェリン(OPG))の産生が促進されること、また、各種糖質の中には、破骨細胞形成抑制因子の産生を抑制するものがあることを新規に見出した。また、本発明者等は、破骨細胞形成抑制因子産生能を有する培養株化細胞をトレハロース存在下で培養すると、その培養液中への破骨細胞形成抑制因子の産生が促進されることを新規に見出した。これらの知見に基づき、本発明は完成されたものである

【0006】

30

即ち、本発明は、上記第一の課題を、破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し得る物質を有効成分とする破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤により解決するものである。

【0007】

又、本発明は、特定の培養株化細胞を用いて、破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し得る物質をスクリーニングする方法を提供することにより、前記第二の課題を解決するものである。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明は、糖質を有効成分とする破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤、及び破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し得る物質をスクリーニングする方法に関するものである。本発明で用いる糖質としては、D-グルコース、D-マンノース、D-ガラクトース、D-アロース、D-アルトロース、D-イドース、D-アラビノース、D-リボース、D-シキロース、D-リキソース、D-フコース、D-フラクトース、D-タロース、L-ソルボース、D-タガトース及びD-ブシコース等の単糖類、マルトース、トレハロース、スクロース、ラクトース、ツラノース及びルチノース等の二糖類、マルトトリオース及びラクトスクロース等の三糖類以上のオリゴ糖、澱粉部分分解物、及びこれら糖質の糖アルコール類、更には、サイクロ $\{\rightarrow 6\}$ - α -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$)の構造を有する四糖類及びサイクロデキストリン等の環状糖質から選ばれる1種又は2種以上の糖質を単独又は適宜組み合わせ用いることができる。本発明

40

50

に於いては、これら糖質の内、殊に、トレハロースは、ヒトを含む哺乳類に於いて、破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し得る物質として、具体的には、破骨細胞形成抑制因子の産生を促進する物質として、好適に用いることができる。また、本発明の破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤に於いてトレハロースを有効成分として用いる場合、トレハロースの異性体である、 α 、 α -トレハロース、 α 、 β -トレハロース、及び β 、 β -トレハロースの1又は複数を、合計で、有効量用いればよく、また、これらトレハロースは純品でなくてもよく、共存する他の成分がトレハロース本来の作用を損なわない限り、その調製方法、純度、性状、由来は特に問わない。

【0009】

本発明で用いるトレハロースの製造方法に関し、本発明は、トレハロースの製造方法自体に関する発明ではないので詳細な説明は割愛するけれども、製造の容易性、経済性、得られるトレハロースの品質を重視する場合には、本発明と同じ出願人による特開平7-143876号公報、特開平7-213283号公報、特開平7-322883号公報、特開平7-298880号公報、特開平8-66187号公報、特開平8-66188号公報、特開平8-336388号公報及び特開平8-84586号公報のいずれかに開示された非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を澱粉部分加水分解物に作用させる方法が好適である。これらの方法によるときは、廉価な材料である澱粉から、高品質の α 、 α -トレハロースが高収量かつ容易に得られる。ちなみに、斯かる方法により調製された市販品としては、結晶性トレハロース粉末（登録商標『トレハ』、固形分重量当りのトレハロース含量98%以上、株式会社林原商事販売）及びトレハロース含有シロップ（商品名『トレハスター』、固形分重量当りのトレハロース含量28%以上、株式会社林原商事販売）がある。なお、 α 、 α -トレハロースは、マルトースに、例えば、本発明と同じ出願人による特開平7-170977号公報、特開平8-263号公報、特開平8-149980号公報のいずれかに記載されたマルトース・トレハロース変換酵素を作用させるか、あるいは、公知のマルトース・ホスホリラーゼ及びトレハロース・ホスホリラーゼを組合せて作用させることによっても得ることができる。

【0010】

α 、 β -トレハロースを調製するには、例えば、同じ特許出願人による特開平4-144694号公報及び特開平4-179490号公報に記載された方法にしたがって澱粉部分加水分解物と乳糖との混合物に、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ（CGTase）と β -ガラクトシダーゼをこの順序で作用させればよい。また、 β 、 β -トレハロースは、公知の化学合成により得ることができる。なお、本発明の破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤は、経口的又は経管的に消化管内に投与されるものであることから、最高純度の糖質に限定される必要性はなく、比較的低純度の糖質、つまり、糖質と共に、その調製方法に起因する他の成分との組成物の形態、つまり、ヒトを含む哺乳類に於いて、糖質による破骨細胞形成抑制因子の産生を調節する作用を実質的に妨げない他の適宜の成分との混合物の形態であってもよい。

【0011】

また、本発明で用いる破骨細胞形成抑制因子の産生調節能を有する物質としては、後述する破骨細胞形成抑制因子の産生調節能を有する物質をスクリーニングする方法によって選択される破骨細胞形成抑制因子の産生調節能を有する物質全般を含む。本発明に於いては、当該スクリーニング方法により選択された物質として、糖質を例示しているが、破骨細胞形成抑制因子の産生調節能を有する物質であって、ヒトを含む哺乳動物に経口的又は経管的に投与可能な物質であれば、糖質と同様、破骨細胞形成抑制因子の産生調節能を有する物質として用いることができる。したがって、本発明に於いては、本発明のスクリーニング方法によって選択された1種又は2種以上の物質を、本発明の破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤の有効成分として用いることができる。

【0012】

本発明の破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤は、破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し得る物質単独の形態であっても、他の成分を適宜配合してなる組成物の形態であってもよい

10

20

30

40

50

。本発明の破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤は、通常、経口摂取、経管流動食や経管輸液等の経管的に投与される形態の食品、健康食品、健康補助食品、及び医薬品などの組成物、より具体的には、溶液状、懸濁液状、乳液状、クリーム状、ペースト状、粉末状、顆粒状、あるいは、それ以外の所望の形状に成形された組成物の形態で提供される。すなわち、組成物が、食品としての形態の場合には、例えば、水、アルコール、澱粉質、蛋白質、繊維、糖質、脂質、各種ビタミン類、ミネラル、着香料、着色料、甘味料、調味料、香辛料、安定剤、酸化防止剤、防腐剤、増粘剤、賦形剤などの食品に通常用いられる原料及び/又は素材を、破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し得る物質の摂取を容易ならしめる成分として配合することができる。斯かる組成物に、さらに、ビフィズス菌、ビフィズス菌増殖糖質、粉末ミルク、乳蛋白分解物（カゼインカルシウムペプチド、カゼインフォス

10

【0013】

また、医薬品としての形態の場合には、例えば、担体、賦形剤、希釈剤及び安定剤の1種又は2種以上を、他の成分として配合し、さらに必要に応じて、例えば、乳酸カルシウム、グリセロリン酸カルシウム、リン酸水素カルシウム及びL-アスパラギン酸カルシウムなどのカルシウム剤、さらには、鎮痛剤、消炎剤、活性型ビタミンD剤、ビタミンK剤、カルシトニン製剤、エストロゲン製剤、蛋白質同化ホルモン製剤などの他の薬剤の1種又は2

20

【0014】

本発明の破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤の用法についてヒトの場合を例にとって説明すると、当該破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤は、経口的に用いても経管的に用いても、ヒトの小腸粘膜上皮細胞に作用し、当該細胞に於ける破骨細胞形成抑制因子の産生を効果的に調節する。また、当該破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤は、経口的又は経管的に投与したいずれの場合にも、哺乳動物の小腸粘膜上皮細胞に作用して、破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し、破骨細胞の形成を効果的に抑制する。したがって、本発明の破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤は、破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤のみならず、骨折や骨のひび等の骨関連疾患を予防、治療、改善するために用いることができる。また、使用目的にもよるが、例えば、骨の健康を維持・増進したりする場合には、通常、食品の形態で経口的に摂取する。また、腰痛・関節痛の緩和、骨の損傷・疾患の治療効果の改善を目的とする場合には、通常、食品又は液剤、シロップ剤、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤などの医薬品の形態で経口的に投与するか、液状の形態で経管的に投与する。用量は、本発明の破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤中に含まれる有効成分の量として、通常、約1g乃至100g/成人/日、望ましくは、約2g乃至50g/成人/日となるようにして毎日投与するか、あるいは、1乃至5回/週の頻度で投与する。投与期間は、使用目的、投与するヒト又は哺乳動物の症状に応じて適宜変わるけれども、通常、1カ月以上、好ましくは、3カ月以上、より好ましくは、6カ月以上投与するのが好適である。破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤の有効成分として糖質を用いる場合には、糖質が生体のエネルギー源としても有用であること、また、糖質は長期間投与しても安全な物質であることから、本発明に於いては、最も好適に用いることができる。

30

40

【0015】

次に、本発明の破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し得る物質をスクリーニングする方法について説明する。この方法は、破骨細胞形成抑制因子産生調節能を有する培養株化細胞を栄養培地中で培養し、これに被検体を添加し、当該被検体存在下で当該培養株化細胞を培養し、次いで、培養上清中に放出された破骨細胞形成抑制因子の産生量を測定し、対照の測定値と対比することにより、被検体の測定値が対照の測定値を上回るか下回るとき

50

、当該被検体が破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し得る物質と判定することにより、破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し得る物質をスクリーニングする方法である。斯かるスクリーニング方法は、特殊な器具、設備を必要としないものの、所望の破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し得る物質を迅速、簡便かつ正確にスクリーニングできる利点を有している。

【0016】

前記培養株化細胞としては、例えば、骨髓腫由来の株化細胞であるMG-63細胞(ATCC CRL 1427)及びヒト胎児小腸上皮細胞由来の株化細胞であるFHS74Int細胞(ATCC CCL 241)を好適に用いることができる。本発明に於いては、これら培養株化細胞のみに限定されることなく、破骨細胞形成抑制因子産生能を有する培養株化細胞であれば、全て用いることができる。また、前記培養株化細胞を培養する際に用いる栄養培地としては、糖質不含有の無血清培地が好適に用いられる。具体的には、糖質及び血清不含有のMEM培地、RPMI 1640培地等の培地であって、当該培養株化細胞が増殖可能な培地であれば、全て用いることができる。培養株化細胞の培養は、通常、培養時間は24乃至72時間で、細胞最終濃度が 1×10^3 乃至 1×10^7 個/ml、好適には、 5×10^3 乃至 1×10^6 個/mlとなるように、当該培養株化細胞を1個乃至2個以上の複数穴を有する培養器、例えば、1個乃至2個以上の複数穴を有するプレート状培養器を用いて、30乃至40、好適には、35乃至38で、5%(v/v)CO₂インキュベーター中にて培養し、次いで、培養に用いたと同様の培地を用いて数回細胞を洗浄し、次いで、培地を除去する。培養液を除去した後の細胞に、前記培地を用いて予め段階希釈しておいたスクリーニングすべき被検体を含む培地を所定量添加し、前記培養条件で1乃至5日間培養する。対照としては、被検体を含まない系を用いた。この培養期間中の所定時間に、培養液の一部と対照の培養液の一部をサンプリングし、各サンプリング液中の破骨細胞形成抑制因子の産生量を測定し、被検体の破骨細胞形成抑制因子の産生量を対照のそれと比較し、被検体の測定値が対照の測定値を上回るか下回るとき、被検体が破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し得る物質と判定する。

【0017】

このように、本発明の破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し得る物質をスクリーニングする方法によれば、目的とする破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し得る物質を短時間で、容易かつ効率的にスクリーニングできるとの実益を有する。また、本発明のスクリーニング方法は、実験動物を必要とせず、小規模の実験室・臨床検査室等に於いて、容易に実施できるとの利便性、経済性を兼備している。

【0018】

次に、実験例に基づき、本発明の破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤の有効性と安全性について説明する。

【0019】

【実験1】

<破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し得る物質による破骨細胞形成抑制因子の産生調節>

FHS74Int細胞(ATCC CCL 241)を96穴プレートに最終細胞濃度 1.2×10^4 個/穴、最終液量200μlとなるように、下記表1に示す無血清培地に、最終濃度で10%(v/v)のウシ胎児血清(ギブコ社製)を添加したD-MEM培地中にて、37、5%(v/v)CO₂インキュベーター内で48時間培養した。培養終了後、表1に示す無血清D-MEM培地を用いて、細胞を3回(200μl/回)洗浄した。次いで、試験群として、前記したと同じD-MEM培地を用いて、表2に示す組成からなる糖質溶液No.1乃至No.7、即ち、D-グルコース(純度99%以上、片山化学工業株式会社製)1mg/ml溶液(糖質溶液No.1)、スクロース(純度99%以上、和光純薬工業株式会社製)1mg/ml溶液(糖質溶液No.2)、マルトース(商品名「マルトースHHH」、純度99%以上、株式会社林原生物化学研究所製)1mg/ml溶液(糖質溶液No.3)、α, α-トレハロース(純度99%以上、和光純薬工業株

式会社製) 1、0.2及び0.04 mg/ml 溶液(糖質溶液 No. 4 乃至 No. 6)、又はD-グルコース(純度99%以上、和光純薬工業株式会社製) 1 mg/ml と α 、 α -トレハロース(純度99%以上、和光純薬工業株式会社製) 1 mg/ml を含む溶液(糖質溶液 No. 7)を調製し、これら各溶液の200 μ l を96穴プレートの各穴に添加した後、細胞を37、5%(v/v) CO₂ インキュベーター内で2日間培養し、細胞培養液上清の一部をそれぞれサンプリングし、各培養上清中の破骨細胞形成抑制因子の産生量を、組換え型ヒト破骨細胞形成抑制因子(アール・アンド・ディー・システム(R & D) 株式会社製)を標準品として、下記に示すウエスタンブロッティング法により測定した。試験群と平行して、対照として、糖質無添加の系を設け、試験群と同様に、培養2日目に、細胞培養液の上清の一部をサンプリングし、その培養上清中の破骨細胞形成抑制因子の産生量を試験群と同様に測定した。

10

【0020】

【表1】

<無血清培地組成>

D-グルコース不含有D-MEM培地(ギブコ社製)

MEM非必須アミノ酸溶液(ギブコ社製)

MEMビルビン酸ナトリウム溶液(ギブコ社製)

亜セレン酸ナトリウム(最終濃度 20 nM、シグマ社製)

トランスフェリン(最終濃度: 5 μ g/ml、シグマ社製)

インスリン(最終濃度: 5 μ g/ml、シグマ社製)

20

【0021】

【表2】

<各糖質溶液>

糖 質 溶 液 No.	糖 質	濃 度
1	D-グルコース	1 mg/ml
2	スクロース	1 mg/ml
3	マルトース	1 mg/ml
4	α 、 α -トレハロース	1 mg/ml
5	α 、 α -トレハロース	0.2 mg/ml
6	α 、 α -トレハロース	0.04 mg/ml
7	D-グルコース + α 、 α -トレハロース	1 mg/ml 1 mg/ml

30

40

【0022】

<ウエスタンブロッティング法>

各試験群及び対照の細胞培養上清15 μ l とジチオスレイトール(DTT) 処理溶液5 μ l とを混合し、この混合液を99 で5分間加熱処理した。各加熱処理液をマルチゲル4/20(第一化学薬品株式会社製)によるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にて展開し、PVDF膜(日本ミリポア株式会社製)に転写した。この

50

P V D F 膜を『ブロックエース』（大日本製薬株式会社製）溶液によりブロッキングした後、1次抗体として、抗ヒト破骨細胞形成抑制因子抗体（アール・アンド・ディー・システム（R & D）株式会社製）と、2次抗体として、H R P 抗ヤギ I g G 抗体（シグマ社製）を用いて、『実験医学 別冊 新遺伝子工学ハンドブック』、222乃至226頁（1999年）（松村正實等編集、羊土社出版）の記載内容に記載されたウエスタンブロッティング法に準じて、抗体と反応した蛋白質を検出した。尚、発色はE C L 試薬（アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）を用いて、『ハイパーフィルムE C L』（アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）を露光させ、『イメージマスター』（アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）により発現強度を測定した。その結果を図1に示す。図1に於いて、各種糖質による破骨細胞形成抑制因子産生量は、対照の培養系での破骨細胞形成抑制因子の発現強度を100として、相対値（％）で表した。その結果、 α , α -トレハロース、及び α , α -トレハロースとD - グルコースとを併用した場合、破骨細胞形成抑制因子の発現強度は対照を上回ったのに対し、D - グルコース、マルトース及びスクロースの場合は、対照を下回った。これらの結果から、 α , α -トレハロースは、破骨細胞形成抑制因子の産生を促進する作用を有するのに対し、D - グルコース、スクロース及びマルトースは、破骨細胞形成抑制因子の産生を抑制する作用を有することが判明した。また、トレハロースとD - グルコースとを併用した場合、D - グルコースは、 α , α -トレハロースの破骨細胞形成抑制因子の産生を促進する作用を増強した。

10

【0023】

【実験2】

20

<破骨細胞形成抑制因子の産生を調節する物質のスクリーニング方法>

実験1で用いたF H s 7 4 I n t 細胞（A T C C C C L 2 4 1）に代えて、M G - 6 3 細胞（A T C C C R L 1 4 2 7）を用いた以外は実験1と同様にして、前記表2に示す組成からなる各種糖質溶液（糖質溶液N o . 1乃至N o . 7）を用いて、これら各糖質がM G - 6 3 細胞からの破骨細胞形成抑制因子の産生を調節するか否かについて調べた。

【0024】

その結果、 α , α -トレハロースは、糖質無添加の対照と比べ、破骨細胞形成抑制因子の産生を顕著に促進したことから、 α , α -トレハロースは、破骨細胞形成抑制因子の産生を顕著に促進する作用を有する物質であることが判明した。一方、D - グルコース、マルトース、及びスクロースは、糖質無添加の対照と比べ、破骨細胞形成抑制因子の産生を顕著に抑制したことから、これら糖質は、破骨細胞形成抑制因子の産生を顕著に抑制する作用を有する物質であることが判明した。

30

【0025】

本例に於いては、各種糖質について、破骨細胞形成抑制因子の産生を調節するか否かをスクリーニングする方法を例示したものであるけれども、糖質以外の他の天然又は合成の各種蛋白質、有機・無機化合物、動植物からの抽出物、多糖類、ホルモン又は各種生理活性物質について、これらの物質が、小腸粘膜上皮細胞由来の細胞からの破骨細胞形成抑制因子の産生を調節するか否かについて同様に調べることができる。

【0026】

40

【実験3】

<急性毒性試験>

5%（w/w）アラビアガムを含む生理食塩水に結晶性 α , α -トレハロース粉末（登録商標『トレハ』、固形分重量当りの α , α -トレハロース含量98%以上、株式会社林原商事販売）、純度99%以上の試薬特級D - グルコース、マルトース又はスクロースの適量を溶解した後、常法にしたがって滅菌した。各糖質水溶液を、体重20乃至25gのd d Yマウス（5群：10匹/群）の腹腔内にそれぞれ注射投与又は胃ゾンデにより経管投与した後、7日間に亘って経過を観察した。その結果、いずれの投与経路によっても、 α , α -トレハロース、D - グルコース、マルトース又はスクロースを、15g/kg体重の割合で投与したいずれのマウスに於いても死亡例は認められなかった。この結果は、本

50

発明の破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤が、ヒトを含む哺乳類に投与しても安全であることを示している。

【0027】

【実験4】

<破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤の投与試験>

35乃至50歳の健常な男女各18人からなるボランティアを3群(男女各3名からなるA群、B群、C群)に分け、結晶性 α 、 α -トレハロース粉末(登録商標『トレハ』、固形分重量当りの α 、 α -トレハロース含量98%以上、株式会社林原商事販売)を濃度10%(w/v)となるように脱イオン水1,000mlに溶解し、膜濾過して除菌し、試験液1とした。また、D-グルコース(純度99以上、和光純薬工業株式会社製)を濃度10%(w/v)となるように脱イオン水1,000mlに溶解し、膜濾過して除菌し、試験液2とした。また、対照として、脱イオン水1,000mlを膜濾過して除菌して対照液とした。これら試験液と対照液は、試験開始まで冷蔵庫内(約10℃)に保管した。A~C群の被験者に対し、試験前夜の午後10時以降、水以外は絶食させ、翌日の午前6時に、A群の被験者には、それぞれ試験液を100ml、B群の被験者には、試験液2をそれぞれ100ml、及びC群の被験者には、対照液をそれぞれ100ml経口摂取させた。その後、各群の被験者を安静に室内で過ごさせ、6時間後の正午に各被験者から採血し、採血した血液を遠心分離(35,000rpmで10分間)し、市販フナコシ株式会社製の破骨細胞形成抑制因子測定用ELISAシステム(商品番号「RS000805」)を用いて、破骨細胞形成抑制因子の産生量を測定した。その結果、 α 、 α -トレハロース(試験液1)を経口摂取させたA群の被験者の血液中の破骨細胞形成抑制因子の産生量は、D-グルコース(試験液2)を経口摂取させたB群、対照液を経口摂取させたC群の被験者と比べ、優位に高い値を示した。又、D-グルコースを経口摂取させたB群は、水のみを経口摂取させたC群と比べ、破骨細胞形成抑制因子の産生量が有意に低かった。

【0028】

また、投与試験終了後、 α 、 α -トレハロースを投与したA群、D-グルコースを投与したB群の被験者の中に、異常を訴えたものはいなかった。本実験結果から、 α 、 α -トレハロースは、生体に経口的に投与したとき、破骨細胞形成抑制因子の産生を促進することが、また、D-グルコースは、破骨細胞形成抑制因子の産生を抑制することが判明した。

【0029】

以下、実施例に基づき、この発明の実施の形態について具体的に説明する。

【0030】

【実施例1】

<健康食品>

常法にしたがって、温度20℃、湿度85%で2週間貯蔵することによって還元糖を自己消化させた馬鈴薯を水洗し、剥皮し、選別した後、遠心式スライサーを用いて厚さ1.5mmのスライスにした。水洗によりスライス表面の澱粉を除いた後、水切りし、温度170℃で約5分間油上げし、油切りした。次いで、ソルターを用いて、食塩7重量部、結晶性 α 、 α -トレハロース粉末(登録商標『トレハ』、固形分重量当りの α 、 α -トレハロース含量98%以上、株式会社林原商事販売)3重量部及び適量の香辛料を含んでなる粉末調味料を均一に振り掛けた後、秤量製袋充填機に移し、そこで秤量し、充填し、包装してスナック菓子状食品を得た。

【0031】

本品は、呈味、風味ともに良好で、経口摂取したとき、小腸粘膜上皮に作用して、破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し、骨疾患と関連する破骨細胞の形成を効果的に抑制し、骨の健康を維持・増進する健康食品として有用である。

【0032】

【実施例2】

<健康食品>

10

20

30

40

50

よく練ったバター 25 重量部に結晶性 α , α - トレハロース粉末 (商品名『トレハ』、固形分重量当りの α , α - トレハロース含量 98 % 以上、株式会社林原商事販売) 18 重量部と鶏卵 10 重量部をこの順序でそれぞれ加え、攪拌してクリーム状とした。これに薄力粉 47 重量部を加え、混練し、布にくるんで 20 分間放置して得られた生地を直径 3 cm の棒状にした後、パラフィン紙にくるみ、4 で 2 時間放置した。その後、生地を 5 mm の厚さに輪切りし、油を引いた天板に並べ、170 のオーブンで 10 分間焼いた後、上面に α , α - トレハロース含有シロップ (商品名『トレハスター』、固形分重量当りの α , α - トレハロース含量 28 % 以上、株式会社林原商事販売) を塗布し、同じ温度でさらに 10 分間焼いてアイスボックスクッキーを得た。

【0033】

10

本品は、呈味、風味ともに良好で、経口摂取したとき、小腸粘膜上皮に作用して、破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し、骨疾患と関連する破骨細胞の形成を効果的に抑制し、骨の健康を維持・増進する健康食品として有用である。

【0034】

【実施例 3】

< 健康食品 >

凍結乾燥紅茶エキス粉末 7 重量部、 α , β - トレハロース 3 重量部、及び D - グルコース 3 重量物を適量の水に溶解し、得られた溶液を、常法にしたがって発酵させ乾燥させた紅茶葉 90 重量部に振り掛けた。常法にしたがって紅茶葉を篩分けし、裁断し、仕上げ乾燥し、選別機により異物を除いた後、和紙を用いて 2 g ずつティーバッグ包装して紅茶のティーバックを得た。

20

【0035】

本品は、冷水 180 ml に約 10 分間浸出させるか、あるいは、90 乃至 100 の熱湯 180 ml に約 2 分間浸出させて飲用する。本品は、呈味、風味ともに良好で、経口摂取したとき、小腸粘膜上皮に作用して、破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し、骨疾患と関連する破骨細胞の形成を効果的に抑制し、骨の健康を維持・増進する健康食品として有用である。

【0036】

【実施例 4】

< 健康食品 >

30

マルトテトラオース含有シロップ (商品名『テトラップ』、固形分重量当りグルコース約 2 %、マルトース約 7 %、マルトトリオース約 11 %、マルトテトラオース約 50 %、デキストリン約 28 % 含有 (株式会社林原商事販売)) 2.7 重量部、 α , α - トレハロース含有シロップ (商品名『トレハスター』、固形分重量当りの α , α - トレハロース含量 28 % 以上、株式会社林原商事販売) 7 重量部、コーヒーエキス 5 重量部、全脂粉乳 2.2 重量部、脱脂粉乳 1 重量部、蔗糖脂肪酸エステル 0.04 重量部、重曹 0.06 重量部及び水 82 重量部を常法にしたがって配合してコーヒー飲料を得た。

【0037】

本品は、呈味、風味ともに良好で、経口摂取したとき、小腸粘膜上皮に作用して、破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し、骨疾患と関連する破骨細胞の形成を効果的に抑制し、骨の健康を維持・増進する健康食品として有用である。

40

【0038】

【実施例 5】

< 健康補助食品 >

結晶性 α , α - トレハロース粉末 (登録商標『トレハ』、固形分重量当りの α , α - トレハロース含量 98 % 以上、株式会社林原商事販売) 55 重量部、コーンスターチ 40.5 重量部及び結晶セルロース 2.5 重量部を混合し、常法にしたがって、適量の水を噴霧滴下しながら混練し、流動層造粒した後、粉碎し、整粒して打錠用粉体を得た。これに潤沢剤として蔗糖脂肪酸エステル 2 重量部を均一に混合した後、直径 11 mm の杵を装着した打錠機により打錠して α , α - トレハロースを含有する錠剤 (約 300 mg / 錠) を得た

50

。

【0039】

本品は、経口摂取し易く、小腸での崩壊性に優れ、小腸粘膜上皮に作用して、破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し、骨疾患と関連する破骨細胞の形成を効果的に抑制し、骨の健康を維持・増進する健康食品として有用である。

【0040】

【実施例6】

<健康補助食品>

結晶性 α 、 α -トレハロース粉末（登録商標『トレハ』、固形分重量当たりの α 、 α -トレハロース含量98%以上、株式会社林原商事販売）39重量部、天然珊瑚粉末 25重量部、粉末ヨーグルト12重量部、グアーガム10重量部、2-O- α -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸1.9重量部及び α -グリコシルヘスペリジン0.1重量部を常法にしたがって適量の水を噴霧滴下しながら混練し、流動層造粒した後、粉碎し、整粒して打錠用粉体を得た。これに潤沢剤として蔗糖脂肪酸エステル3重量部を均一に混合した後、直径6mmの杵を装着した打錠機により打錠して錠剤（約200mg/錠）を得た。

10

【0041】

本品は、カルシウムが補強されている上に経口摂取しやすいので、小腸での崩壊性に優れ、小腸粘膜上皮に作用して、破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し、骨疾患と関連する破骨細胞の形成を効果的に抑制し、骨の健康を維持・増進する健康補助食品である。

20

【0042】

【実施例7】

<健康補助食品>

結晶性 α 、 α -トレハロース粉末（登録商標『トレハ』、固形分重量当たりの α 、 α -トレハロース含量98%以上、株式会社林原商事販売）3重量部、 α 、 β -トレハロース（純度95%以上）1重量部、 β 、 β -トレハロース1重量部、及びプルラン3重量部を混合し、直径6mmの杵を装着した打錠機により打錠して錠剤（約300mg/錠）を得た。

【0043】

本品は、プルランを配合していることから、適度な強度を有し、小腸での崩壊性に優れ、小腸粘膜上皮に作用して、破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し、骨疾患と関連する破骨細胞の形成を効果的に抑制し、骨の健康を維持・増進する健康補助食品である。

30

【0044】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明の糖質を有効成分とする破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤によれば、破骨細胞形成を効果的に調節することができるとの優れた実益を有する。また、本発明の破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤は、糖質を有効成分とすることから安全であり、呈味、風味ともに良好で、経口摂取又は経管投与したとき、何等不都合なく容易に摂取又は生体に投与でき、穏やかに小腸粘膜上皮細胞に作用して、当該細胞からの破骨細胞形成抑制因子の産生を効果的に調節する。その結果、本発明の破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤は、骨疾患と密接な関連性を有する破骨細胞の形成を効果的に調節し、骨の健康を維持・増進するために有用である。

40

【0045】

また、本発明の破骨細胞形成抑制因子の産生調節能を有する物質のスクリーニング方法によれば、前記破骨細胞形成抑制因子の産生調節剤の有効成分となり得る物質を幅広く迅速かつ容易に検索できることから、糖質以外の破骨細胞形成抑制因子の産生を調節し得る物質を容易かつ効率的にスクリーニングすることを可能とするものである。

【0046】

斯くも優れた作用効果を奏する本発明が斯界に与える影響は大である。

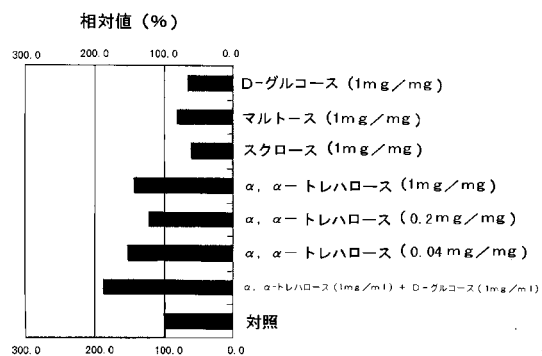
【0047】

50

【図面の簡単な説明】

【図 1】各種糖質存在下、非存在下に於ける培養 2 日目の細胞培養上清中に含まれる破骨細胞形成抑制因子の発現強度（相対値）を示す図である。

【図 1】



フロントページの続き

(72)発明者 栗本 雅司

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内

審査官 瀧野 留香

(56)参考文献 特開2000-198736(JP, A)

特開2001-122798(JP, A)

特開2001-231573(JP, A)

Cell, Volume 89, Issue 2, 18 April 1997, Pages 309-319

Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 248(3), p 696-700

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/7004

A61K 31/7016

A61K 33/06

A61P 19/02

A61P 19/08

A61P 43/00

C12Q 1/02

G01N 33/15

G01N 33/50

C07H 3/02

C07H 3/04

A23L 1/30

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)