

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3636207号

(P3636207)

(45) 発行日 平成17年4月6日(2005.4.6)

(24) 登録日 平成17年1月14日(2005.1.14)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

F I

A 6 1 K 31/525  
 A 6 1 K 31/198  
 A 6 1 K 31/401  
 A 6 1 K 31/43  
 A 6 1 K 31/661

A 6 1 K 31/525  
 A 6 1 K 31/198  
 A 6 1 K 31/401  
 A 6 1 K 31/43  
 A 6 1 K 31/661

請求項の数 13 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平4-266781  
 (22) 出願日 平成4年9月10日(1992.9.10)  
 (65) 公開番号 特開平5-201864  
 (43) 公開日 平成5年8月10日(1993.8.10)  
 審査請求日 平成11年8月4日(1999.8.4)  
 (31) 優先権主張番号 特願平3-261288  
 (32) 優先日 平成3年9月13日(1991.9.13)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000000217  
 エーザイ株式会社  
 東京都文京区小石川4丁目6番10号  
 (72) 発明者 荒木 誠一  
 茨城県土浦市永国1126-9  
 (72) 発明者 鈴木 護  
 茨城県つくば市松代1-30-2  
 (72) 発明者 藤本 昌俊  
 茨城県つくば市東光台2-5-4  
 (72) 発明者 井田 勝三  
 埼玉県本庄市銀座1-17-24

審査官 中木 亜希

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫賦活・感染防御剤及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

リボフラビン、リボフラビンモノヌクレオチド、もしくはフラビンアデニンジヌクレオチド及び/又はそれらの薬理的に許容される塩から選ばれるリボフラビン誘導体を含む感染症の予防、治療剤(ただし、壊死感染症及び牛の角結膜炎を除く)。

【請求項2】

リボフラビン誘導体がリン酸リボフラビンナトリウムである請求項1記載の感染症の予防、治療剤(ただし、壊死感染症及び牛の角結膜炎を除く)。

【請求項3】

プロリン及び/又はグルタミンを更に包含して成る請求項1又は2記載の感染症の予防、治療剤。 10

【請求項4】

抗生剤(ただし、ゲンタマイシンを除く)を更に包含して成る請求項1又は2記載の感染症の予防、治療剤。

【請求項5】

水溶性高分子又はレシチンを更に包含して成る請求項1又は2記載の感染症の予防、治療剤。

【請求項6】

水溶性高分子がポリビニルピロリドン、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、 20

コンドロイチン硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリビニルアルコールから選ばれる 1 種又は 2 種以上の水溶性高分子である請求項 5 記載の感染症の予防、治療剤。

【請求項 7】

レシチンが卵黄レシチン、大豆レシチン又はそれらの水添レシチンから選ばれる 1 種又は 2 種以上のレシチンである請求項 5 記載の感染症の予防、治療剤。

【請求項 8】

ワクチンをさらに包含して成る、請求項 1 又は 2 記載の感染症に対するワクチン製剤。

【請求項 9】

ヒトの白血球減少症、自己免疫疾患、敗血症又は尿路感染症、豚の下痢、流行性肺炎、萎縮性鼻炎又は伝染性胃腸炎、鶏の肺炎又はマレック病、牛の下痢、肺炎又は乳房炎、猫白血病から選ばれる感染症に対する請求項 1 又は 2 記載の感染症の予防、治療剤。

10

【請求項 10】

リボフラビン、リボフラビンモノヌクレオチド、もしくはフラビンアデニンジヌクレオチド及びノ又はそれらの薬理的に許容される塩から選ばれるリボフラビン誘導体を含む、敗血症の予防、治療剤。

【請求項 11】

リボフラビン、リボフラビンモノヌクレオチド、もしくはフラビンアデニンジヌクレオチド及びノ又はそれらの薬理的に許容される塩から選ばれるリボフラビン誘導体をヒトを除く動物に投与することより成る、ヒトを除く動物の感染症（ただし壊死感染症及び牛の角結膜炎は除く）の予防、治療方法。

20

【請求項 12】

豚の下痢、流行性肺炎、萎縮性鼻炎又は伝染性胃腸炎、鶏の肺炎又はマレック病、牛の下痢、肺炎又は乳房炎、猫白血病から選ばれる感染症である請求項 11 記載のヒトを除く動物の感染症（ただし壊死感染症及び牛の角結膜炎は除く）の予防、治療方法。

【請求項 13】

抗生剤（ただし、ゲンタマイシンを除く）又はワクチンを、ヒトを除く動物に併用投与することより成る請求項 11 又は 12 記載のヒトを除く動物の感染症（ただし壊死感染症及び牛の角結膜炎を除く）の予防、治療方法。

【発明の詳細な説明】

30

【0001】

本発明はヒト又は動物等の免疫機能を賦活させ感染を防御する医薬に関する。

【0002】

【従来技術及び発明の背景】

近年、免疫学の進歩により、ヒト及び動物の種々の疾患あるいは感染症は、免疫機能の低下または免疫機能の不全が原因と考えられるようになっている。

【0003】

例えば、ヒトの場合、気管支喘息、アレルギー疾患、関節リュウマチ、自己免疫疾患、栄養障害、外科手術、高齢化、妊娠等により、多くの場合免疫機能が低下または不全になり、呼吸器感染症、敗血症、尿路感染症等の感染症を併発する。従来、このような疾患や感染症に対しては各種抗生物質が投与されている。

40

【0004】

一方、畜水産業においては、家畜、家禽または養殖魚を効率よく飼育するために、大規模経営、過密飼育が行われているが、このような飼育に対しては、抗生物質の大量投与が採用されている。

【0005】

このような状況の中で、特開昭 62 - 286923 号公報はタンパク質の分解で生ずるアミノ酸の一種であるプロリン（ピロリジン - 2 - カルボン酸）に免疫増強作用があることが開示されている。また、特公昭 63 - 38985 号公報はプロリンの誘導体であるグルタミンが免疫増強作用があることを開示している。

50

## 【0006】

ところで、本発明で使用されるリボフラビンは、生体内でリン酸化され補酵素（例えば、フラビンモノヌクレオチド、フラビンアデニンジヌクレオチド）としてアミノ酸酸化酵素、キサンチン酸化酵素など20数種のフラビン酵素を形成し、生体の酸化還元機構に関与し、糖質、脂質、タンパク質などの代謝に重要な役割を果たしている。

## 【0007】

また、リボフラビンは、ヒトの場合、これが欠乏すると、口唇炎、急慢性湿疹、日光性湿疹、脂漏性湿疹、結膜炎、口角炎、舌炎、ペラグラ等を招来することが知られている。従って、リボフラビンはこれらビタミンB<sub>2</sub>欠乏症の予防、治療に使用されている。

## 【0008】

そして、リボフラビン誘導体は、リボフラビンと実質的に同様の薬理作用があり適応症も同じことが知られている。

## 【0009】

## 【発明が解決しようとする課題】

抗生物質を継続的に使用すると、耐性菌が発生し、特定の抗生物質の効力が減弱する。また、最近クローズアップされている病院内感染の問題もあり、抗生物質の使用量を減らし、免疫機能そのものを高めることによる予防、治療薬の開発が望まれている。

## 【0010】

一方、畜水産業における過密飼育では、ストレスや幼若期における免疫不全により各種感染症が多発するという問題があり、その対策として抗生物質の大量投与を行うと、今度は抗生物質の残留や耐性菌の増加の問題が起きている。

## 【0011】

本発明者らは、上述の抗生物質の問題点に鑑み、ヒトあるいは動物に安全な、感染防御剤について長年鋭意検討を重ねてきた。その結果、リボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体に免疫機能賦活作用があることを見出した。そして、さらに、水溶性高分子等に、リボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体の免疫機構賦活作用を増強し、かつ持続させる作用があることも見出し、本発明を完成させた。

## 【0012】

## 【課題を解決するための手段】

本発明はリボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体を含有する免疫賦活・感染防御剤、すなわち感染症の予防、治療剤（ただし、壊死感染症及び牛の角結膜炎を除く）に関する。ここに、リボフラビン誘導体とは、フラビンモノヌクレオチド、フラビンアデニンジヌクレオチド及びリボフラビンの薬理的に許容される塩（例えば、リン酸リボフラビンナトリウム、リン酸リボフラビンのモノジエタノールアミン塩など）である。

## 【0013】

プロリン及びグルタミンに免疫機能賦活作用があることは前述したとおりであるが、本発明に従ってリボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体に、プロリン及び/またはグルタミンを同時に使用することによって、意外にも、免疫機構賦活作用が相乗的に向上することがわかった。従って、本発明はリボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体を含有し、さらにプロリン及び/またはグルタミンを含有する免疫賦活・感染防御剤である。

## 【0014】

そして、本発明のリボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体及び抗生剤（ただし、ゲンタマイシンを除く）を含有する免疫賦活感染防御剤は、両者を併用することによって、それぞれ単独で使用した場合に得られる以上の、いわゆる相乗効果を意外にも発現し、結果として抗生剤の使用量を著しく減少させるという重要な効果を与えることが見出された。つまり、本発明はリボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体及び抗生剤（ただし、ゲンタマイシンを除く）を含有する免疫賦活感染防御剤である。

## 【0015】

また、リボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体と、水溶性高分子またはレシチンとより成る免疫賦活・感染防御剤は、リボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体と、水

10

20

30

40

50

溶性高分子またはレシチンとを併用することにより、リボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体の感染防御効果が意外にも増強されることがわかった。従って、本発明はリボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体と、水溶性高分子またはレシチンとより成る免疫賦活・感染防御剤である。

【0016】

更に、本発明のリボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体及びワクチンを含有する免疫賦活感染防御効果のあるワクチン製剤は、両者を併用することによって、それぞれ単独で使用した場合に得られる感染防御効果以上の、いわゆる相乗効果を意外にも得られることがわかった。つまり、本発明はリボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体及びワクチンを含有するワクチン製剤である。

10

【0017】

また、本発明はリボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体と、水溶性高分子またはレシチンとより成る免疫賦活・感染防御剤の製造方法に関する。

【0018】

リボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体と、レシチンとより成る免疫賦活・感染防御剤、リボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体と水溶性高分子とより成る免疫賦活・感染防御剤は、一部のリボフラビン誘導体やレシチンが水に溶けにくい為、単なる混合では製剤化できないが、リボフラビン誘導体、レシチンを乳化することで製剤化が可能となる。従って、本発明はレシチン並びに、リボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体を溶媒に乳化させることを特徴とする製造方法、リボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体と水溶性高分子を溶媒に乳化することを特徴とする製造方法である。

20

【0019】

本発明の目的は、免疫機能を賦活させることにより、上述したような抗生物質（ただし、ゲンタマイシンを除く）投与に伴う欠点がなくヒトあるいは動物に安全な、感染から生体を防御する薬剤を提供することである。

【0020】

本発明における免疫賦活とは、ヒト、動物例えば魚類等の免疫機能を高めることを意味する。

【0021】

従って、本発明はヒトあるいは動物等の免疫機能を高めることにより各種の疾患の予防、治療、各種感染症に対する予防、治療薬として有用であるので、特に症例が特定されるものではない。例えば、ヒトの場合、癌、臓器移植、白血球減少症、関節リウマチ、自己免疫疾患、気管支喘息、栄養障害、外科手術、加齢疾患あるいは呼吸器感染症、敗血症、尿路感染症などの各種感染症である。

30

【0022】

また、動物の場合、例えば、豚の下痢、流行性肺炎、萎縮性鼻炎、伝染性胃腸炎等、鶏の肺炎、マレック病、牛の下痢、肺炎、乳房炎、ペットのエイズ及び猫白血病（ただし、牛の角結膜炎を除く）である。

【0023】

さらに、本発明の適用される養殖魚の感染症も特定されないが、例えば、レンサ球菌、類結節症等の細菌感染症、ウイルス感染症等広範である。

40

【0024】

本発明においては、リボフラビン及びリボフラビン誘導体は単独で用いることができるし、また、両者を組み合わせて用いることもできる。リボフラビン誘導体とは、フラビンモノヌクレオチド、フラビンアデニンジヌクレオチド及びリボフラビンの薬理的に許容される塩（例えば、リン酸リボフラビンナトリウム、リン酸リボフラビンのモノジエタノールアミン塩など）である。

【0025】

本発明におけるリボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体の用量は使用される動物種等により異なるため、特に限定されない。一般には、体重1 Kg当たり0.1~500mgの範囲

50

であり、好ましくは、1～100mgの範囲である。

【0026】

本発明におけるリボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体とプロリン及び/またはグルタミンとの配合比は限定されないが、一般に、リボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体1重量部に対し0.1～10重量部であり、好ましくは、0.5～5重量部である。

【0027】

本発明においては、プロリン及びグルタミンは単独でリボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体と配合することができるし、両者を混合して配合してもよい。

【0028】

そして、併用される抗生剤は特に限定されないが、例えば、アモキシシリン、テトラサイクリン、塩酸オキシサイクリン等を挙げることができる。 10

【0029】

アモキシシリンはペニシリン系抗生剤で細胞壁合成阻害による抗菌作用を有し、アモキシシリン感性の大腸菌、インフルエンザ菌、溶血レンサ球菌、ブドウ球菌などによる各種感染症に対して適応される。

【0030】

さらに、本発明におけるリボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体と抗生剤の配合比は特に限定されないが、一般には、リボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体1重量部に対し抗生剤0.01～1重量部であり、好ましくは、0.05～0.5重量部である。

【0031】

そして、本発明におけるリボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体と、水溶性高分子またはレシチンとの配合比は特に限定されないが、一般には、リボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体1重量部に対し水溶性高分子またはレシチン0.01～100重量部であり、好ましくは0.05～50重量部である。さらに好ましくは0.1～10重量部である。 20

【0032】

水溶性高分子は特に限定されるものではないが、好ましくは、ポリビニルピロリドン、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、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル及びポリビニルアルコールなどがある。これらは1種又は2種以上を任意選択して使用することができる。 30

【0033】

レシチンは特に限定されないが、卵黄レシチン、大豆レシチン及び各水添レシチンが挙げられ、1種または2種以上を任意選択して使用する。

【0034】

また、本発明において併用されるワクチンの種類や配合比は、ヒト、動物例えば魚類等の種類により異なり、特に限定されるものではないが、例えば、特に動物では、鶏マイコプラズマワクチン、鶏伝染性コリーザA・C型不活性化ワクチン、豚ボルデテラ不活性化ワクチン及び豚ヘモフィルス(アクチノバチルス)不活性化ワクチン等の各種ワクチンがある。 40

【0035】

本発明にかかる免疫賦活・感染防御剤がヒト、動物等に投与される際の剤形は特に限定されず、注射剤、顆粒剤、散剤、錠剤等とすることができる。

【0036】

本発明を製剤化する場合、剤型に応じた各種の添加剤が配合され得る。例えば、固形または粉末状に製剤する場合には賦形剤、着色剤、滑沢剤、結合剤、被覆剤等が配合されうる。

【0037】

難溶性物質を注射剤とする場合には、しばしば界面活性剤等の溶解補助剤が用いられる。本発明においても、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油等の界面活性剤等が使用されるが、 50

これらの物質は、リボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体の免疫賦活・感染防御作用を意外にも増加させることを見出し添加されるものであって、単なる溶解補助剤としての作用を有するだけではない。

【0038】

本発明中のリボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体を含有する、または、これらにさらにプロリン及び/またはグルタミンを含有する免疫賦活・感染防御剤を食品に添加することにより、個々の疾病の予防を特異目的としている生体調節機能を有する食品、いわゆる機能性食品として用いることができる。

【0039】

さらに、抗生剤にみられる耐性菌の影響、残留の問題も無いので、安全かつ生体防御調節機能を有する飼料、すなわち、機能性飼料として、豚、鶏、牛、馬、羊などの家畜や魚類、ペット（犬、猫、鳥）などに使用することもできる。

10

【0040】

本発明中のリボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体を含有する、免疫賦活・感染予防剤、または、リボフラビン及び/またはリボフラビン誘導体及び抗生剤を含有する免疫賦活・感染防御剤は、ヒト、動物に投与する場合、筋肉注射、静脈注射、皮下注射、経口投与で行う。

【0041】

【作用】

本発明者等はリボフラビン誘導体が免疫機構を賦活する生体内作用機構を完全には解明していないが、白血球中の食細胞例えばマクロファージ及び好中球を活性化していることが認められており、また白血球数（特に好中球数）を増加させることを見出している。

20

【0042】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。実施例で使用する物質の投与量に関する記載、例えば、「10mg/Kg i.m.」は体重1Kg当たり10mgを筋肉注射したという意味である。また、表1～表7の $\chi^2$ 検定の欄で使用する「\*」及び「\*\*」は各々 $p < 0.05$ 及び $p < 0.01$ を表す。

【0043】

【実施例1】

S L C : I C R 雄性マウス各々10匹（週齢5～6、体重25～30g）にリボフラビン10、30、100mg/Kg及びコントロールとして生理食塩水を筋肉注射した。そして24時間後に臨床由来の大腸菌（ $2.6 \times 10^7$  CFU/Mouse, 0.2ml）を各マウスに皮下接種し、感染7日目の生存数から生存率を求め、コントロールに対する有意差を求めた。結果を表1に示した。

30

【0044】

【表1】

表 1

試料	生存率%	$\chi^2$ 検定
コントロール（生理食塩水 i.m.）	10	
リボフラビン 10mg/Kg i.m.	20	
リボフラビン 30mg/Kg i.m.	50	
リボフラビン 100mg/Kg i.m.	90	**

40

【0045】

表1に見る如く、リボフラビンの効果は投与量依存的でありリボフラビンが感染防御効果を有していることは明らかである。その効果は、リボフラビン30mg/Kg 及び100mg/Kg投与での生存率は各々50%及び90%という強い感染防御効果を示している。

【0046】

50

## 【実施例 2】

S L C : I C R 雄性マウス各々10匹 ( 週齢 5 ~ 6、体重 22 ~ 30g ) に、表 2 に示すようにグルタミン、プロリン及びリボフラビンをそれぞれ単独または組み合わせて、及びコントロール ( 生理食塩水 ) を筋肉注射した。そして24時間後に臨床由来の大腸菌 (  $2.6 \times 10^7$  C FU/Mouse, 0.2ml ) を各マウスに接種し、感染 7 日目の生存数から生存率を求めた。

## 【 0 0 4 7 】

更に、グルタミン、プロリン、リボフラビンをそれぞれ単独または組み合わせたものについて、それぞれコントロールに対する有意差を求めて得た結果を表 2 に記載する。

## 【 0 0 4 8 】

## 【表 2】

10

表 2

試料	生存率%	$\chi^2$ 検定
コントロール (生理食塩水 i.m. )	0	
グルタミン 100mg/Kg i.m.	30	
プロリン 100mg/Kg i.m.	40	*
グルタミン 100mg/Kg , プロリン 100mg/Kg i.m.	50	*
リボフラビン 10mg/Kg i.m.	20	
リボフラビン 30mg/Kg i.m.	50	*
リボフラビン 100mg/Kg i.m.	90	**
グルタミン 100mg/Kg , プロリン 100mg/Kg , リボフラビン 10mg/Kg i.m.	100	**

20

## 【 0 0 4 9 】

更に、グルタミン、プロリン及びリボフラビンを組み合わせたものについて、グルタミン、プロリンを組み合わせたものに対する有意差を表 3 に記載する。

## 【 0 0 5 0 】

## 【表 3】

30

表 3

試料	生存率%	$\chi^2$ 検定
グルタミン100mg/Kg, プロリン 100mg/Kg i.m.	50	
グルタミン100mg/Kg, プロリン 100mg/Kg , リボフラビン 10mg/Kg i.m.	100	*

## 【 0 0 5 1 】

表 2 に見る如く、プロリン 100mg/Kg 投与は生存率 40% で、コントロールと比較して有意差が出ており感染防御効果を示している。リボフラビン 30mg/Kg 及び 100 mg/Kg 投与での生存率は、各々 50% 及び 90% であって、プロリンと比較しても投与量依存的に強い感染防御効果を示していることが分かる。

40

## 【 0 0 5 2 】

また、表 2 からはグルタミン、プロリン及びリボフラビンを組み合わせることにより、それぞれ単独に得られる効果の和としての相加効果以上の効果、つまり、相乗効果が得られることが確認された。

## 【 0 0 5 3 】

更に、表 3 からグルタミン、プロリン及びリボフラビンを組み合わせたものが、生存率

50

100%と極めて強い感染防御効果を示している。これを、グルタミンとプロリンとの組み合わせたものの効果に、リボフラビン単独の効果を加えた効果と比較すると、明らかに有意な相乗効果が得られることが確認された。

【0054】

【実施例3】

S L C : I C R 雄性マウス各々10匹(週齢5~6、体重25~30g)にリン酸リボフラビンナトリウム10、30、100、300mg/Kg及びコントロールとして生理食塩水を筋肉注射した。そして24時間後に臨床由来の大腸菌( $2.6 \times 10^7$  CFU/Mouse, 0.2ml)を各マウスに皮下接種し、感染7日目の生存数から生存率を求め、コントロールに対する有意差を求めた。結果を表4に示した。

【0055】

【表4】

表 4

試料	生存率%	$\chi^2$ 検定
コントロール(生理食塩水 i.m.)	0	
リン酸リボフラビンナトリウム 10mg/Kg i.m.	10	
リン酸リボフラビンナトリウム 30mg/Kg i.m.	40	*
リン酸リボフラビンナトリウム 100mg/Kg i.m.	60	**
リン酸リボフラビンナトリウム 300mg/Kg i.m.	100	**

【0056】

表4に見る如く、感染防御効果はリン酸リボフラビンナトリウム10、30、100、及び300mg/Kgにおいて用量依存性である。特に300mg/Kgは極めて強い感染防御効果を示すことが確認された。

【0057】

【実施例4】

S L C : I C R 雄性マウス各々10匹(週齢5~6、体重25~30g)にリン酸リボフラビンナトリウム10mg/Kg、アモキシシリン(AMPC)0.39mg/Kgをそれぞれ単独及び組み合わせて、感染24時間前及び感染30分後に筋肉注射した。臨床由来の大腸菌( $2.6 \times 10^7$  CFU/Mouse, 0.2ml)を各マウスに皮下接種し、感染7日目の生存数から生存率を求め、結果を表5に示した。

【0058】

【表5】

表 5

試料	生存率%	$\chi^2$ 検定
コントロール(生理食塩水 i.m.)	0	
アモキシシリン0.39 mg/Kg i.m.	60	**
リン酸リボフラビンナトリウム10 mg/Kg i.m.	10	
アモキシシリン0.39 mg/Kg i.m., リン酸リボフラビンナトリウム10 mg/Kg i.m.	100	**

【0059】

表5に見る如く、アモキシシリンとリン酸リボフラビンナトリウムとを組み合わせることにより、それぞれ単独に得られる効果の和としての相加効果以上の効果、つまり、有意な

10

20

30

40

50

相乗効果が得られることが確認された。

【0060】

【実施例5】

S L C : I C R 雄性マウス各々10匹(週齢5~6、体重25~30g)にフラビンモノヌクレオチド(FMN)、リボフラビンそれぞれ100mg/Kgとポリビニルピロリドン(PVP-K30)、カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC Na)、精製ダイズレシチン、卵黄レシチン、ポリオキシエチレン(60)硬化ヒマシ油(HCO-60)、ポリオキシエチレン20モルソルビタンモノオレート(Tween-80)及びコントロール(生理食塩水)を下表6のような組み合わせで、筋肉注射した。そして3日後に臨床由来の大腸菌( $2.6 \times 10^7$  CFU/Mouse, 0.2ml)を各マウスに皮下接種し、感染7日目の生存数から生存率を求め、コントロールに対する有意差を求めた。結果を表6に示した。

10

【0061】

【表6】

表 6

試料	生存率%	$\chi^2$ 検定	
コントロール(生理食塩水 i.m.)	0		
FMN 100mg/Kg i.m.	30		20
FMN 100mg/Kg, PVP-K30 300mg/Kg i.m.	40	*	
FMN 100mg/Kg, CMC Na 30mg/Kg i.m.	50	*	
FMN 100mg/Kg, 精製ダイズレシチン200mg/Kg i.m.	70	**	
FMN 100mg/Kg, 卵黄レシチン 100mg/Kg i.m.	90	**	
FMN 100mg/Kg, HCO-60 10mg/Kg i.m.	30		
リボフラビン 100mg/Kg	40	*	
リボフラビン 100mg/Kg, PVP-K30 300mg/Kg i.m.	90	**	30
リボフラビン 100mg/Kg, CMC Na 30mg/Kg i.m.	80	**	
リボフラビン 100mg/Kg, 精製ダイズレシチン200mg/Kg i.m.	90	**	
リボフラビン 100mg/Kg, 卵黄レシチン 100mg/Kg i.m.	100	**	
リボフラビン 100mg/Kg, HCO-60 10mg/Kg i.m.	50	*	
リボフラビン 100mg/Kg, Tween-80 10mg/Kg i.m.	70	**	40

【0062】

表6に見る如く、ポリビニルピロリドン(PVP-K30)、カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC Na)、ポリオキシエチレン(60)硬化ヒマシ油(HCO-60)、ポリオキシエチレン20モルソルビタンモノオレート(Tween-80)などの各種水溶性高分子や、精製ダイズレシチン、卵黄レシチンなどのレシチンが、FMN、リボフラビンの感染防御効果を増強し、かつ持続させることが確認された。

【0063】

【実施例6】

表7のようにリボフラビンまたは、リン酸リボフラビンナトリウムと卵黄レシチンを単独

50

または組み合わせて、リン酸緩衝液で20倍に希釈し、更に、市販のActinobacillus pleuropneumoniae 不活性化ワクチンと混合して、ワクチン製剤とした。これと、コントロールのリン酸緩衝液とを、それぞれ0.5 mlずつS L C : I C R 雄性マウス各々20匹 (週齢3、体重12~15 g) に、腹腔内投与した。投与後14日後にActinobacillus pleuropneumoniae  $3 \times 10^8$  をマウスに0.5ml 腹腔内接種して、7日後の生存率を表7に示した。この実験は、ワクチン国家検定法に準じて実施した。

【0064】

【表7】

表 7

試料	生存率%	$\chi^2$ 検定
コントロール (リン酸緩衝液 i.p.)	10	
ワクチン i.p.	40	
リボフラビン 100mg/Kg i.p.	25	
リボフラビン 100mg/Kg, ワクチン i.p.	80	**
リボフラビン 100mg/Kg, 卵黄レシチン 100mg/Kg, ワクチン i.p.	95	**
リン酸リボフラビンナトリウム100mg/Kg i.p.	5	
リン酸リボフラビンナトリウム100mg/Kg, ワクチン i.p.	50	*
リン酸リボフラビンナトリウム100mg/Kg, 卵黄レシチン 100mg/Kg, ワクチン i.p.	60	**

【0065】

表7に見る如く、リボフラビン、リン酸リボフラビンナトリウム及びワクチンを組み合わせることにより、それぞれ単独で使用した感染防御効果の和である相加効果以上の、つまり有意な相乗効果が確認された。この相乗効果は、ワクチンの感染防御効果が高まったことを示し、つまりはワクチン増強効果にほかならない。

【0066】

【実施例7】

フラビンモノヌクレオチド (FMN) 5 g、D-ソルビトール 5 g、リン酸二ナトリウム 0.04 g、リン酸一ナトリウム 0.04 g 及びポリビニルピロリドン (PVP-K30) 15 g を注射用水に溶解し 100mlとした。この溶液を 5 mlアンプルに分注充填し、蒸気滅菌し、免疫賦活感染防御剤とした。

【0067】

【実施例8】

実施例7において、PVP-K30の15 gの代わりに、ヒドロキシプロピルセルロース (HPC) 3 g を使用する以外は実施例7と同様に行い、免疫賦活感染防御剤とした。

【0068】

【実施例9】

実施例7において、PVP-K30の15 gの代わりに、ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) 2 g を使用する以外は実施例7と同様に行い、免疫賦活感染防御剤とした。

【0069】

【実施例10】

実施例7において、PVP-K30の15 gの代わりに、コンドロイチン硫酸ナトリウム 20 g

10

20

30

40

50

を使用する以外は実施例 7 と同様に行い、免疫賦活感染防御剤とした。

【0070】

【実施例 1 1】

卵黄レシチン 10 g を超音波乳化機を用いて分散させた後、これに D - ソルビトール 5 g、リン酸二ナトリウム 0.03 g、リン酸一ナトリウム 0.02 g 及び F M N 3 g を溶解させ、注射用水に溶解し 100ml とした。この溶液を 5 ml アンプルに分注充填し、蒸気滅菌し、免疫賦活感染防御剤とした。

【0071】

【実施例 1 2】

実施例 1 1 において、卵黄レシチン 10 g の代わりに、部分水添ダイズレシチン 10 g を使用し、F M N は 4 g に変更して使用する以外は実施例 1 1 と同様に行い、免疫賦活感染防御剤とした。

10

【0072】

【実施例 1 3】

微細結晶リボフラビン 5 g を、D - ソルビトール 5 g、カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC Na) 1 g、リン酸二ナトリウム 0.04 g 及びリン酸一ナトリウム 0.04 g を含有する注射水溶液で懸濁し 100 ml とした。この懸濁液を超音波乳化機を用いて分散させ、5 ml アンプルに分注充填し、蒸気滅菌し、免疫賦活感染防御剤とした。

【0073】

【実施例 1 4】

実施例 1 3 において、CMC Na の 1 g の代わりに、H P M C の 3 g を使用する以外は実施例 1 3 と同様に行い、免疫賦活感染防御剤とした。

20

【0074】

【実施例 1 5】

実施例 1 3 において、CMC Na の 1 g の代わりに、ポリビニルアルコール 3 g を使用する以外は実施例 1 3 と同様に行い、免疫賦活感染防御剤とした。

【0075】

【実施例 1 6】

部分水添卵黄レシチン 10 g 及び D - ソルビトール 5 g を超音波乳化機を用いて分散させた後、これにリン酸二ナトリウム 0.03 g、リン酸一ナトリウム 0.02 g 及び F M N 3 g を溶解させた。この溶液にリボフラビン 5 g を添加し懸濁し、更に注射用水に溶解し 100ml とした。この溶液を 5 ml アンプルに分注充填し、蒸気滅菌し、免疫賦活感染防御剤とした。

30

【0076】

実施例 7 ~ 1 6 に示した製造法により本発明の免疫賦活感染防御剤は調製される。

【0077】

【発明の効果】

上記の試験例から、免疫賦活・感染防御剤およびワクチン製剤は、優れた免疫機構賦活作用を有し、従って、各種の疾患の予防、治療、各種感染症に対する予防、治療薬として有用である。

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	
A 6 1 K 31/685	A 6 1 K 31/685	
A 6 1 K 31/765	A 6 1 K 31/765	
A 6 1 K 31/79	A 6 1 K 31/79	
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	G
A 6 1 K 39/02	A 6 1 K 39/02	
A 6 1 K 39/39	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/04	1 7 1
A 6 1 P 37/04	A 6 1 P 31/12	1 7 1
// C 0 7 D 475/14	A 6 1 P 37/04	
C 0 7 D 499/54	C 0 7 D 475/14	
	C 0 7 D 499/54	

(56)参考文献 特開平03 - 195456 (JP, A)  
 特開平03 - 058790 (JP, A)  
 特開平02 - 042954 (JP, A)  
 特公平03 - 022366 (JP, B2)  
 特公平01 - 057943 (JP, B2)  
 特公平03 - 001287 (JP, B2)  
 特公昭45 - 026694 (JP, B1)  
 米国特許第04219545 (US, A)  
 Antibiotiki, 1972年, Vol.17, No.3, p.273-276

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, DB名)

A61K 31/525  
 A61K 31/198  
 A61K 31/401  
 A61K 31/43  
 A61K 31/661  
 A61K 31/685  
 A61K 31/765  
 A61K 31/79  
 A61K 39/00  
 A61K 39/02  
 A61K 39/39  
 A61K 45/00  
 C07D499/54  
 C07D475/14  
 REGISTRY(STN)  
 CA(STN)  
 CAOLD(STN)