

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-515457

(P2015-515457A)

(43) 公表日 平成27年5月28日 (2015.5.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 36/48 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/78 J	4 B 0 1 8
<b>A 6 1 K 36/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/78 X	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 31/7048 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7048	4 C 0 8 8
<b>A 6 1 K 31/075 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/075	4 C 2 0 6
<b>A 6 1 P 1/16 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/16	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-500720 (P2015-500720)	(71) 出願人	514240633
(86) (22) 出願日	平成25年3月20日 (2013.3.20)		フランス マース ナムローゼ フェン
(85) 翻訳文提出日	平成26年11月21日 (2014.11.21)		ノートシャップ
(86) 国際出願番号	PCT/BE2013/000014		ベルギー王国、ペー8400 オースト
(87) 国際公開番号	W02013/166563		エンデ、アルベルト イー プロメナーデ
(87) 国際公開日	平成25年11月14日 (2013.11.14)		53、ブス 41
(31) 優先権主張番号	2012/0195	(74) 代理人	110001896
(32) 優先日	平成24年3月20日 (2012.3.20)		特許業務法人朝日奈特許事務所
(33) 優先権主張国	ベルギー (BE)	(72) 発明者	マース、フランス
			ベルギー王国、ペー8400 オースト
			エンデ、アルベルト イー プロメナーデ
			53
		(72) 発明者	ピーターズ、ルク
			ベルギー王国、ペー2000 アントウ
			エルベン、アメリカレイ 80
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 デスモディウムから植物抽出物を製造する方法およびその抽出物

## (57) 【要約】

本発明は、デスモディウム (Desmodium) 科から、デスモディウム・アドセンデンス (Desmodium adscendens) 植物を選択し、前記デスモディウムの植物部位から抽出を行って、画分を得、前記画分から植物抽出物を得る、ピニトールについて定量化された植物抽出物を製造する方法であり、デスモディウム・アドセンデンスから特徴的な抽出物を得て、これにより、前記植物抽出物の製剤がピニトールに対して定量化される、方法に関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

デスマディウム (Desmodium) 科から、デスマディウム・アドセンデンス (Desmodium adscendens) 植物を選択し、  
前記デスマディウムの植物部位から抽出を行って、画分を得、  
前記画分から植物抽出物を得る、  
ピニトールについて定量化された植物抽出物を製造する方法であり、  
デスマディウム・アドセンデンスから特徴的な抽出物を得て、  
これにより、前記植物抽出物の製剤がピニトールに対して定量化される、方法。

**【請求項 2】**

ピニトール、特に D - ピニトールについての、デスマニウム・アドセンデンスの前記定量に対してバリデートされた分析方法を実施し、  
所定の、定量化された D・アドセンデンス製剤を全体 (totum) として製造する、  
請求項 1 記載の方法。

**【請求項 3】**

D - ピニトールに対して定量化された組成物を生成しながら実施するところの前記分析方法において、生物学的に制御された単離を行い、  
前記組成物は、繰り返し豊富化され、多数の画分が単離されるものであり、  
有意な量の D - ピニトールを含む浸出液が得られる、請求項 2 記載の方法。

**【請求項 4】**

前記組成物の構成成分は、前記製造工程についての再現性の獲得により基準化される、  
請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 5】**

デスマディウム・アドセンデンスの構成成分の主成分および D - ピニトールの総量が、  
適切な分析方法により定量され、  
特に、抽出工程、抽出後に得られる生成物および抽出条件が評価され、最適化される、  
請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記植物抽出物は、葉、枝、茎および / または花もしくは果実のいずれかを含む、デスマディウム・アドセンデンスの地上部からなる画分から得られる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記植物抽出物は、花または果実、所望により種子のいずれかを含むデスマディウム・アドセンデンスの季節性の地上部からなる画分から得られる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記植物抽出物は、根を含む、デスマディウム・アドセンデンスの地下部からなる画分から得られる、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記植物部位は、まず、乾燥される、請求項 8 記載の方法。

**【請求項 10】**

前記植物部位は、次いで、粉碎または断片化される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記植物部位は、微粉化されて、粉体の形態となる、請求項 10 記載の方法。

**【請求項 12】**

前記粉体は、それ自体、医薬品剤型に変換される、請求項 11 記載の方法。

**【請求項 13】**

デスマディウム・アドセンデンスの前記植物部位の抽出物は、低級アルキルアルコールでの抽出により調製される、請求項 1 ~ 12 記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 14】

デスマディウム・アドセンデンスの前記植物部位の抽出物は、メタノール、エタノールおよび/またはイソプロパノール、またはこれらの組み合わせを含む低級アルキルアルコールでの抽出により調製される、請求項 13 記載の方法。

## 【請求項 15】

デスマディウム・アドセンデンスの前記植物部位の抽出物は、水での抽出により調製される、請求項 13 または 14 記載の方法。

## 【請求項 16】

デスマディウム・アドセンデンスの前記植物部位の抽出物は、酢酸エチル、*n*-ヘキサンまたはこれらの組み合わせといった極性の小さいまたは非極性の溶媒での抽出により調製される、請求項 13 または 14 記載の方法。

10

## 【請求項 17】

デスマディウム・アドセンデンスの前記植物部位の抽出物は、二酸化炭素といった超臨界状態の溶媒での抽出により調製される、請求項 13 または 14 記載の方法。

## 【請求項 18】

デスマディウム・アドセンデンスの前記植物部位の水性浸出液が、乾燥され、必要に応じて粉末化された所定量の葉を、所定量の水とりわけ蒸留水中で、所定時間煮沸することにより、温められ浸出液へとさらに調製される、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 19】

20

デスマディウム・アドセンデンスの前記植物部位の前記水性浸出液は、その後、冷却され、さらに得られた画分が溜められてから濾過され、さらに得られた濾液はとりわけ真空下で濃縮され、次いで、凍結乾燥されて凍結乾燥物を形成する、請求項 18 記載の方法。

## 【請求項 20】

デスマディウム・アドセンデンスの、前記植物部位の前記水性浸出液は、その後、冷却され、さらに得られた画分が溜められてから濾過され、さらに得られた濾液はとりわけ真空下で濃縮され、次いで、噴霧乾燥される、請求項 18 記載の方法。

## 【請求項 21】

とりわけ、乾燥され、必要に応じて微粉化された所定量の植物部位を、所定量の水とりわけ蒸留水中に、所定時間含ませることにより、デスマディウム・アドセンデンスの、前記植物部位の水性浸出物をさらに冷間加工して抽出物を得る、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

## 【請求項 22】

10 ~ 20 : 1、とりわけ 14 ~ 16 : 1 の比率に応じて、1 kg の乾燥した植物部位から、それぞれ、60 ~ 70 g、とりわけ約 65 g の抽出物を得る、請求項 9 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 23】

所定量の前記浸出液は、さらに、

メタノール溶出でのカラムクロマトグラフィに供され、所定の画分が回収され、

移動相を MeOH / H<sub>2</sub>O : 5 : 1 とする薄層クロマトグラフィによって分析され、クロマトグラフパターンが決定される、請求項 7 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

## 【請求項 24】

約 20 g の前記抽出物は、

Sephadex LH-20 によるメタノール溶出でのカラムクロマトグラフィに供され、これにより、約 100 mL が回収され、

さらに、移動相が MeOH / H<sub>2</sub>O : 5 : 1 で層厚が約 0.25 cm のシリカゲル・薄層クロマトグラフィによって分析され、これらパラメータを基にクロマトグラフパターンが決定される、請求項 23 記載の方法。

## 【請求項 25】

前記画分を、それらのクロマトグラフパターンに基づいて合わせ、いくつかの、とりわ

50

け 1 1 個のサブ画分を得る、請求項 2 3 または 2 4 記載の方法。

【請求項 2 6】

アニスアルデヒド / 1 %  $H_2SO_4$  のメタノール溶液を噴霧し、約 1 2 0 で 1 0 分間加熱した後、緑色のスポットを示す、前記サブ画分 5 ~ 1 1、とりわけ 2 0 0 m g を合わせ、

前記画分は、メタノール溶出でのカラムクロマトグラフィにさらに供され、所定の画分、とりわけ 1 0 0 m l は、再度回収され、分析される、請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 2 7】

前記カラムからの前記サブ画分 4 ~ 5、とりわけ 1 2 0 m g を合わせ、  
合わせたものを、同じ条件下、さらなるカラムクロマトグラフィに供し、純粋な、とりわけ白色の生成物を得る、請求項 2 6 記載の方法。

10

【請求項 2 8】

前記抽出物は、分離され、かつ、単離された生成物は、メチル化サイクリトール、3 - O - メチル - カイロ - イノシトール、すなわち D - ピニトールとして同定される、請求項 3 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 9】

とりわけガスクロマトグラフィにおいて、糖アルコール、特にキシリトールが内部標準として選択される、請求項 2 8 記載の方法。

【請求項 3 0】

前記キシリトールに代えて、ソルビトール、マンニトール、必要に応じてズルシトールおよびイノシトールといった他の糖アルコールも選択され、ただし、後の 2 つの糖アルコールはより選択されない、請求項 2 9 記載の方法。

20

【請求項 3 1】

分離された前記抽出物から、L - ピニトールが生成される、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 2】

熱帯産のデスマディウム・アドセンデンスの植物抽出物から出発する、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 3】

栽培されたデスマディウム・アドセンデンスの植物抽出物から出発する、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 3 4】

デスマディウム・アドセンデンス製剤の、フラボノイド・プロファイルによる拡張された特徴付けによる、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 5】

デスマディウム・アドセンデンスの凍結乾燥物におけるフラボノイド割合およびプロファイルが 0 . 1 ~ 5 %、とりわけ前記割合が 1 % のオーダーである場合に、ピテキシンを表すシグナルの和として規定される、D . アドセンデンスの浸出液の典型的な凍結乾燥物におけるフラボノイドの総量が約 1 . 0 5 % であるとしてピテキシンが確認される、請求項 3 4 記載の方法。

40

【請求項 3 6】

デスマディウム・アドセンデンスからの D - ピニトールの単離によって、肝炎に対する作用、とりわけ予防作用の点において D - ピニトールに対して定量化された基準化抽出物が、前記デスマディウム・アドセンデンス植物から得られ、

D - ピニトールは、活性成分を構成する、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 7】

デスマディウム・アドセンデンスからの D - ピニトールの単離によって、肝炎に対する治療作用の点において D - ピニトールに対して定量化された基準化抽出物が、前記デスマ

50

ディウム・アドセンデンス植物から得られ、

D - ピニトールは、活性成分を構成する、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 8】

化学的、物理的、感染性または免疫性的原因による肝臓損傷に関連して、肝炎に対する作用の点において D - ピニトールに対して定量化された基準化抽出物が、前記デスマディウム・アドセンデンス植物から得られる、請求項 3 6 または 3 7 記載の方法。

【請求項 3 9】

請求項 1 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の方法によって得られ、

哺乳動物の肝臓の保護または哺乳動物の肝臓疾患の予防に使用される、植物抽出物。

10

【請求項 4 0】

哺乳動物の肝臓疾患の治療のための、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法によって得られる植物抽出物。

【請求項 4 1】

肝炎に対し活性である分子、D - ピニトールによって定量化され、デスマディウム・アドセンデンス植物から得られ、

D - ピニトールは、デスマディウム・アドセンデンスから単離され、前記 D - ピニトールは活性成分であり、基準化された形態である、請求項 3 9 または 4 0 記載の植物抽出物。

【請求項 4 2】

前記植物抽出物は、0 . 1 ~ 1 0 %、好ましくは 4 ~ 5 % のピニトール、とりわけ D - ピニトールを含む、請求項 3 9 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の植物抽出物。

20

【請求項 4 3】

D - ピニトールを含む前記植物抽出物は、前記抽出物を含む組成物の形態で哺乳動物に与えられ、

前記組成物は、医薬組成物、食品組成物および / または飲料組成物からなる群から選択される、請求項 3 9 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の植物抽出物。

【請求項 4 4】

哺乳動物の肝臓疾患の予防方法に使用する、請求項 3 9 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載のデスマディウム・アドセンデンス植物の抽出物であり

30

前記予防方法は、デスマディウム・アドセンデンスの前記抽出物の有効量を哺乳動物に投与するステップを含む、抽出物。

【請求項 4 5】

哺乳動物の肝臓疾患の治療方法に使用する、請求項 3 9 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載のデスマディウム・アドセンデンスの抽出物であり、

前記治療方法は、デスマディウム・アドセンデンスの前記抽出物の有効量を哺乳動物に投与するステップを含む、抽出物。

【請求項 4 6】

所定の対象群に対して、抗酸化剤として用いられ、

とりわけ、前記対象群は、ヒト、とりわけアルコール中毒者によって、および / またはメタボリックシンドローム患者、とりわけ 2 型糖尿病患者によって構成される、請求項 3 9 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の植物抽出物の使用。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、デスマディウム ( Desmodium )、より具体的にはデスマディウム・アドセンデンス ( Desmodium adscendens ) から植物抽出物を製造する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

50

古くから、植物は、その薬効成分が利用されている。多くの現存する医薬が、タイヘイヨウイチイ (*Taxus brevifolia*) のパクリタキセル (タキソール)、ケシ (*Papaver somniferum*) のモルヒネといった植物の有効成分、または、それらの誘導体である。アフリカの伝統的な医薬にも、多くの植物が利用されており、その中にデスモディウム・アドセンデンスがある。実際、この植物は、地理的分布や用途の点から、多くの熱帯または亜熱帯の国々、とりわけ、アフリカ、南アメリカが産地であり、平原、草地および道すがらに生えているため、容易に採取し得る。これにより、この植物は、費用面から薬物治療を受けることがしばしば困難な住民にとって、医薬としての魅力的である。よって、この植物は、伝統的な医薬として、とりわけ喘息、疼痛、発熱、癲癇、肝炎、筋痙攣に利用されている。このような目的においては、その葉、枝または茎の熱水抽出物が、浸出液として利用されている。

10

#### 【0003】

この植物の葉の抽出物を含む、市販のフラボノイド製剤がいくつかあり、これらは健康促進効果を奏する栄養補助食品として市場に流通している。また、肝臓疾患の治療のためにも、薬用植物は何世紀にもわたって使用されている。オオアザミ (*Silybum marianum*)、ピクロリザクロア (*Picrorrhiza kurroa*)、ウコン (*Curcuma longa*)、カンゾウ (*Glycyrrhiza glabra*)、キダチコミカンソウ (*Phyllanthus amarus*) およびカルメグ (*Andrographis paniculata*) は、肝臓保護作用を有するのではないかと考えられてきた植物である。肝臓は、多くの重要な機能を果たす人体において非常に重要な臓器であり、肝臓の不調は、人体に大きな影響を与える。実際に、肝硬変は、西洋では主たる死因の1つである。さらに、黄疸は、非共役型または間接型ビリルビン、共役型または直接型ビリルビンの増加のために発生し、皮膚や強膜の黄変を生じる不調である。硬変は、瘢痕化 (線維症) を伴う進行性のネクローシスの結果として起こるものであり、瘢痕間に生じて正常組織を損傷する結節再生を伴う。これにより、鬱血、門脈高血圧症、脳症、腹水症等が起こる。肝硬変の症例のうち60~70%は、アルコールの過剰摂取によって起こる。他は、ウイルス性肝炎、胆管疾患および原発性ヘモクロマトーシスによって起こる。肝不全は、ウイルス性肝炎、薬物や化学薬品、慢性肝臓疾患によって引き起こされる肝臓の広範囲のネクローシスや、ライ症候群のようなネクローシスを伴わない肝機能障害の末期である。

20

30

#### 【0004】

肝臓損傷のメカニズムについて理解し、細胞の損傷レベルまで理解を深めるために、アラニンアミノ基転移酵素 (ALT) やアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST) といった血液パラメータが測定される。ASTが細胞質だけでなくミトコンドリアにも存在するのに対し、ALTは、細胞質にのみ存在する。細胞壁が損傷している間、ALTおよびASTが放出されるため、アミノ基転移酵素は急増する。ASTは、ALTよりも後に増加し、より深刻なネクローシスが起こっていることを示唆する。 - グルタミルトランスフェラーゼ (GT) やアルカリホスファターゼ (AP) といった膜酵素は、体細胞のほぼすべての細胞膜に存在する。ガンマ - GTは、ウイルス性または細菌性肝炎の場合や、薬物やアルコール中毒の場合に上昇する。アルカリホスファターゼもまた、肝臓疾患の診断および経過観察のために測定される。これらのパラメータは、肝臓の損傷の状況を示す。

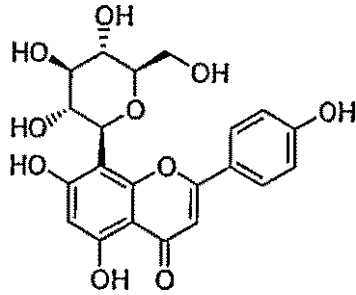
40

#### 【0005】

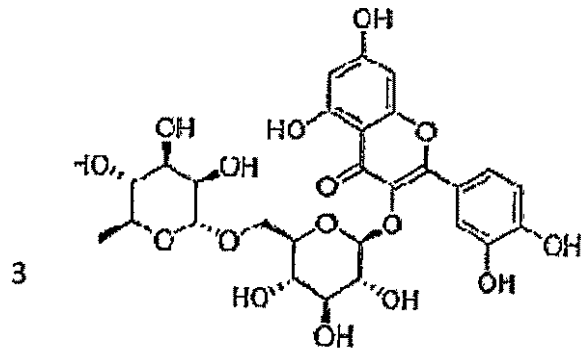
本植物であるデスモディウム・アドセンデンスは、下記 (1) ~ (6) にそれぞれ示されるピテキシン (1)、ルチン (2) およびイソピテキシン、テトラヒドロイソキノリンのサルソリン (3)、ソヤサポニン I (4) を含むソヤサポニン類等のフラボノイドと、チラミン (5) やホルデニン (6) 等の - フェニルエチルアミン類と、インドール - 3 - アルキルアミンを特に含む。

#### 【0006】

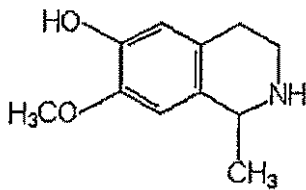
## 【化 1】



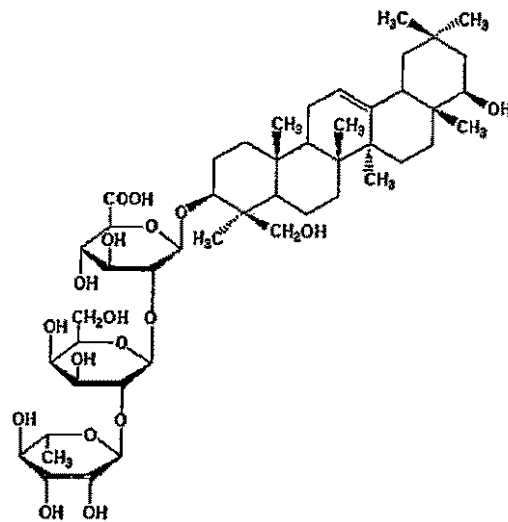
(1)



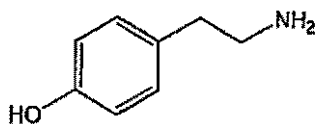
(2)



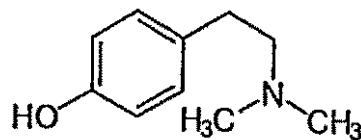
(3)



(4)



(5)



(6)

## 【 0 0 0 7 】

## [ 先行技術 ]

M U A N D A らによる 2 0 1 1 年の科学論文は、デスモディウム・アドセンデンスの葉について取り上げている。論文では、肝臓の感染症に対する積極的な効果が示されている。この論文には、フェノール化合物が同定されたという分析方法が示され、いくつかの成分の存在への言及がある。しかし、後に明らかになるようにこの開発において中心的な役割を担う他の成分について何ら言及がない。このため、少なくとも本明細書で言及する重要な成分に関する限り、この文献の重要性は、まったくもって未解決なものである。

## 【 0 0 0 8 】

チュベリー ( T U B E R Y ) の欧州特許出願公開第 0 3 0 9 3 4 2 号明細書は、A 型または B 型のウイルス性肝炎および中毒性肝炎の治療におけるデスモディウムの使用を開示

10

20

30

40

50

しているが、経験的に (a p r i o r i) その他の肝臓疾患には用いられておらず、その医薬、とりわけ中毒者やがん治療のための医薬でもない。したがって、この文献は、使用のための対象臓器としての肝臓とともに、デスマディウム、特にデスマディウム・アドセンデンスと関連するものではある。使用の際の剤型として、該植物の乾燥粉末に加え、浸出液も挙げられている。この文献は、さらに、デスマディウムが有効成分としてインドールアルカロイドを含むという主たる要素に言及している。より具体的には、この文献は、特徴付けがなされていない D・アドセンデンスの抽出物に関連しているのみである。この文献は、インドールアルカロイドについての定性的または定量的な情報は何ら提供していない。言い換えると、この文献は、本明細書において重要な、目的とする決定的な構成要素を定量化するためのバリデートされた分析方法を提供するものではない。さらに、この文献は、肝炎の治療薬としてのみ、D・アドセンデンスを提示している。

10

#### 【 0 0 0 9 】

これまで、肝臓疾患は、治療が非常に困難である一方、他方でほぼ避けることができなかった。そのため、これら肝臓疾患をどのように防ぐかということは、本明細書においても問題である。

#### 【 0 0 1 0 】

##### [ 発明の目的 ]

したがって、本発明の一例における主な目的は、上述した問題を解決し得るデスマディウム・アドセンデンスの定量化された抽出物を調製することである。このような観点に基づき、デスマディウム・アドセンデンスの抽出物の肝臓保護作用を調べた。肝臓疾患に適する物質を探した際、イノシトール群に属する物質を試験した。これらは、ヘキサヒドロキシシクロヘキサン誘導体、特に環状糖アルコールを含む化合物類を表す。

20

#### 【 0 0 1 1 】

イノシトールは、砂糖のように通常の食事に含まれ、中毒性がない。対象としてヒトを含むいくつかの研究によれば、D - ピニトールは、糖血症に対しての必要な制御能を改善するというインスリン類似の効果を発揮する。この研究は、グルコース輸送については明らかでないが、実に、準最大濃度における D - ピニトールとインスリンとの相乗作用を示唆している。

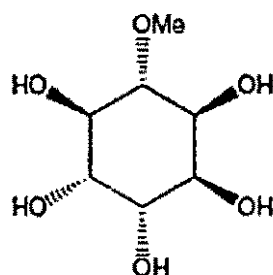
#### 【 0 0 1 2 】

D - ピニトールは、低分子量の環状糖アルコールである。D - ピニトールは、D - カイロ - イノシトールのメチル誘導体である。D - ピニトールおよび D - カイロ - イノシトールは、いずれも、インスリン誘導性シグナル伝達におけるリンクを形成するホスファチジルイノシトール類と構造的な相関がある。以下の構造を有する D - ピニトールは、多くの野菜、大豆製品および松樹（ただしこれらに限られない）中に存在し、体内においてカイロ - イノシトールに代謝される。

30

#### 【 0 0 1 3 】

##### [ 化 2 ]



40

#### 【 0 0 1 4 】

D - ピニトールは、その特性から他のイノシトール類とは区別される。このことは、それぞれの異性体が含まれると理解されるべきであり、他のイノシトール類には、不活性の L - ピニトールも含まれる。

50



## 【 0 0 1 5 】

D - ピニトールは、さらに、メチルエーテル基を有する点において、他のイノシトール類と相違する。この構造により、D - ピニトールは、グルコース代謝および糖尿病に当然に影響を及ぼす。インピトロにおける薬理学的な特性によれば、D - ピニトールが、低血糖、抗動脈硬化作用および免疫システムへの影響を含む有効性を持つことが、まさに示唆されている。低血糖活性に関する限り、D - ピニトールは、グルコース輸送とインスリン感受性を改善し得る。これは、D - ピニトールが、ヒトにおいて、生命活動を実際に担っている物質であるD - カイロ - イノシトールに部分的に代謝されることに起因している。D - カイロ - イノシトールは、効能を示す活性化合物であるD - ピニトールの部分代謝によって生じ、糖尿病、特に2型糖尿病に効果がある。言い換えると、インスリン感受性またはインスリン抵抗性が改善される。実際、D - ピニトールは体内で、特に2型糖尿病の場合、D - カイロ - イノシトールに代謝される。また、D - ピニトールはそのまま抽出されることもある。

10

## 【 0 0 1 6 】

言い換えると、D - ピニトールは、一見しただけでは、本明細書で述べる肝臓疾患の予防や治療に大きな貢献を果たす上で、経験的に有用と考えられるべきものとは推定し得ず、まして、重要な要素とも推定し得ない。

## 【 発 明 の 概 要 】

## 【 0 0 1 7 】

したがって、本発明によれば、ピニトールによって定量化された植物抽出物の生産方法が提供される。植物は、デスマディウム科が選択される。デスマディウムの植物部位から画分が抽出され、植物抽出物は、その画分から得られる。特筆すべきは、デスマディウム科のうち、デスマディウム・アドセンデンスが選択されたことである。同定された抽出物は、デスマディウム由来であり、この植物抽出物の製剤は、ピニトールによって定量化される。

20

## 【 0 0 1 8 】

本発明によれば、ピニトール、特にD - ピニトールは、主たる活性成分として挙げられ、重要な役割を果たし、中心的な位置を占める。

## 【 0 0 1 9 】

しかしながら、M U A N D Aによれば、D - ピニトールは、D . アドセンデンスの成分として何ら言及されていない。

30

## 【 0 0 2 0 】

しかしながら、アミコーゲン社による国際公開第2004/084875号は対照的に、ピニトールや、肝臓を保護するためのピニトールを含む植物抽出物に関連する。しかしながら、この文献は、大豆、マツ、ケンボナシ、エゾウコギ、イナゴマメといった植物について言及しているものの、繰り返しになるがデスマディウム、ましてやD . アドセンデンスに関しては言及していない。さらに、この文献では、特徴付けがなされていない抽出物のみが取り扱われている。組成物についての定性的または定量的な情報は提供されておらず、ただピニトールやカイロ - ピニトールが含まれているだけである。

40

## 【 0 0 2 1 】

ベバリッジらの文献 ( A u s t . J . C h e m . , 1 9 7 7 , 3 0 , 1 5 8 3 - 1 5 9 0 ) によれば、2種のデスマディウム中のD - ピニトールに関するガスクロマトグラフィによる分析が報告されている。しかしながら、この文献は、フジボツルハギ ( D . i n t o r t u m ) およびデスマディウムウンシナタム ( D . u n c i n a t u m ) に関するものであり、2つの植物種は、D . アドセンデンスとは異なる。

## 【 0 0 2 2 】

同様に、フォードらの文献 ( A u s t . J . A g r i c . R e s . 1 9 7 8 , 2 9 , 9 6 3 - 9 7 4 ) によれば、2種のデスマディウム種中のD - ピニトールの存在が報告されている。しかしながら、この文献は、フジボツルハギおよびムラサキヌスビトハギ ( D . t o r t u o s u m ) に関するものであり、繰り返しになるが、2つの植物種は、D

50

・アドセンデンスとは異なる。

【0023】

中国の文献 (Zongcaoyao 2007, 38(8)、1157-1159) に言及するケミカルアブストラクツのデータベースについても同じことが言え、D・アドセンデンスとは植物学的にタイプも異なるヒメノハギ中にD・ピニトールが存在することを報告しているだけである。

【0024】

インドの文献 (Curr. Sci. 1982, 51, 936-937) に言及する N A P R A L E R T のデータベースにも同じことが言える。ハイマキエハギ中に (+) - ピニトール、すなわちD・ピニトールが存在することを報告しているが、この文献は、ハイマキエハギに関するものであり、繰り返しになるが、この植物種は、D・アドセンデンスとは異なる種類である。

10

【0025】

要約すると、D・ピニトールまたはピニトールがデスマディウム・アドセンデンスとは異なる他のデスマディウム属に含まれていると考えられる事実は、この物がD・アドセンデンスに存在するか否かについては何ら予測的価値をもたないといえる。同じ属に属する2つの異なる種は、常に、定性的および定量的に、二次代謝物についての異なる化学的プロファイルを示す。D・ピニトールを含む植物種としては、他の属および他の科に属する多数の植物種が存在する。一般参照される「Dictionary of Natural Products on DVD」には、D・ピニトールが「幅広い植物に分布している」ことが明記されている。このことは、デスマディウム属とD・ピニトールの間には、一貫性があるまたは予測し得る関係性は存在しないことを示している。

20

【0026】

上記論文は、他のデスマディウムの種にピニトールが存在することについて言及しているが、そのことはデスマディウム・アドセンデンスにおけるピニトールの存在が予測できるということを意味するものではないにもかかわらず、これら文献とのかかわりでは、該デスマディウム製剤は、「全体」または「全部」としてピニトールを含んでいると認識される。これはすべて、あまりにも先見がないように思われる。実際のところ、D・アドセンデンスとは異なる他のデスマディウム種がピニトールを含んでいると考えられる事実は、この物、すなわちピニトールがデスマディウム・アドセンデンスに存在するかどうかを予測する上で、何ら価値がない。一般に、所定の植物種の薬効が、しばしばたった1つの種に限定され、同じ属および/または同じ科に属する他の種には存在しないことが知られている。ある植物の科のうちの唯一の植物だけが、ある種の効果を達成するのに有用であることは、今回のケースのように、より詳しくは、デスマディウム科からのD・A・が主として所定の疾患に対して向けられるように、あるいは、モルヒネに対するケシと同様に、本当によくあることである。

30

【0027】

最後に、N A R A Y A N A N という短報は、さらにピニトールについて取り上げている。しかしながら、D・アドセンデンスについてではなく、ブーゲンビリア (Bougainvillea spectabilis) について取り上げている。

40

【0028】

発明の有利な実施形態によれば、バリデートされた分析方法が、D・ピニトールの定量化のために実施される。所定の定量化されたD・アドセンデンスの試料が「全体 (total)」として生産される。

【0029】

発明の特定の実施形態によれば、D・ピニトールが定量化された試料を得るために、分析方法が開発される。該方法において、生物学的に制御された単離が行われ、生成物は繰り返し濃縮され、膨大な画分が単離され、得られる浸出液もまた、大量のD・ピニトールを含む。したがって、本発明の生物学的に制御された単離によって、所望の成分は、一般的な植物の科から特に選択された植物において、よりの絞った方法により単離され、極

50

めて多くの研究、すなわち所望の効果を奏するこの植物成分を見出す研究を省略するという莫大な利点を生じる。

【 0 0 3 0 】

発明の特定の実施形態によれば、上記成分は、基準化される。この成分は、熱帯産または栽培された系統のいずれにおいても、植物により本来的に変量しているので、再現性を保証し、その結果該成分を基準化することが必要である。

【 0 0 3 1 】

発明の特別な実施形態によれば、糖アルコール、より具体的にはキシリトールが、内部標準として選択される。実際に、内部標準は、ガスクロマトグラフィにおいて、インジェクションのバラツキを正すために常に添加されなければならない。これらの選択された物質は、分析される物質、今回の場合はD - ピニトールと同様の挙動を示す。上記キシリトール以外にも、ソルビトール、マンニトール、ズルシトールおよびイノシトールのような他の糖アルコールも選択し得るが、後の2つの糖アルコールは、あまり選択されない。キシリトールは、水酸基の数がD - ピニトールと同じであるという、構造上の理由から好ましい。このことは、誘導体化反応が水酸基上で起こることから、本件において決定的な理由である。

10

【 0 0 3 2 】

適切な分析方法により、デスマディウム・アドセンデンスの主成分およびD - ピニトールの総量が測定される。抽出工程において、抽出後に得られる生成物および条件が評価され、最適化される。

20

【 0 0 3 3 】

発明の限定された実施形態によれば、第一に、デスマディウムの地上部が、特に季節とほとんどまたはまったく関係なく利用される。その結果、これらを収穫することにより、年間を通じて有用性があるという利点がある。また、これらは実験的に確立され、実施されている。

【 0 0 3 4 】

発明の追加の実施形態によれば、植物抽出物は、デスマディウムの地上部のうち、花、果実、種子等のより季節性のある一時的な地上部から調製される。これにより、植物を掘り起こすことなく容易に収穫し得る。

【 0 0 3 5 】

30

発明のさらなる追加の実施形態によれば、さらに非季節性のデスマディウムの地下部も、植物抽出物を調製するために利用される。これにより、デスマディウムは、特に、葉、茎、枝および/または他の地上部だけでなく、これらの地下部、また所望であれば花および果実、または、種さえも含むほぼすべての部位が利用され得る。

【 0 0 3 6 】

これにより、ほぼすべての部位が利用されるという優れた利点があり、ほぼ何も無駄にはならない。そして、これは、環境にも完全に配慮した財政的にも有利な方法であって、今日の先導的指針である持続可能な経済にも完全に適合し、したがって、これが決定的な基準である関連する熱帯および亜熱帯地域にとって特に重要である。

【 0 0 3 7 】

40

発明の方法の基本実施形態の追加の一面によれば、D . アドセンデンスの上記植物部位は、まず、乾燥される。

【 0 0 3 8 】

発明の好ましい実施形態によれば、デスマディウム・アドセンデンスの画分は、まず、すり碎かれ、特に、粉体状にされる。この粉体は、所望により、直接、医薬品剤型に変換されてもよい。

【 0 0 3 9 】

発明のより好ましい実施形態によれば、デスマディウムの葉および/または枝の水性抽出物が、乾燥した、所望により粉末化した所定量の葉（特に5 × 2 0 0 g）を所定量の水、とりわけ蒸留水（特に3 L）中で所定の時間（特に1時間）煮沸することにより得られ

50

る浸出液として、調製される。

【0040】

発明のさらに好ましい実施形態によれば、デスマディウム・アドセンデンスの、葉や枝といった植物部位の水性浸出液が用いられ、その後冷却され、とりわけ、得られた画分はその後まとめられてから濾過される。得られた濾液は特に真空下で濃縮された後、凍結乾燥または噴霧乾燥される。

【0041】

発明の特に好ましい実施形態によれば、デスマディウムの地上部および/または地下部の抽出物は、水、低級アルキルアルコール、非極性溶媒またはこれらの組み合わせといった溶媒（ただしこれらに限定されない）や、超臨界状態の溶媒を用いて調製される。

10

【0042】

浸出液または浸軟物、すなわち温物または冷物としては、水に加えて、たとえば、メタノール、エタノールおよびイソプロパノール（ただしこれらに限定されない）などの低級アルキルアルコール、またはそれらの水-アルコール混合物や、酢酸エチル、*n*-ヘキサン（ただしこれらに限定されない）などの極性の小さい溶媒または非極性溶媒またはこれらの組み合わせが使用されてもよい。必要に応じて、たとえば、二酸化炭素（ただしこれに限定されない）といった超臨界状態の溶媒が使用されてもよい。最後に、抽出物に代えて、植物原料の乾燥粉末を、さらに抽出することなく使用してもよい。

【0043】

発明の特別な実施形態によれば、1 kgの乾燥葉から、60~70 g、とりわけ約65 gの乾燥浸出液が得られ得る。

20

【0044】

発明のより有利な実施形態によれば、所定量（特に約20 g）の浸出液は、カラムクロマトグラフィ（特にSephadex LH20を用いてメタノール溶出を行う）に供され、所定の画分（特に100 mL）が回収され、薄層クロマトグラフィ（特にシリカゲル、層厚0.25 cm、移動相としてMeOH/H<sub>2</sub>O：5：1）によって分析され、クロマトグラフパターンが決定される。

【0045】

発明のさらなる実施形態によれば、画分は、クロマトグラフパターンに基づいて、いくつかの（好ましくは11の）サブ画分にまとめられる。

30

【0046】

発明のさらなる実施形態によれば、選択された画分5~11（特に200 mg、さらには着色されたスポットを示すもの）のいくつかは、まとめられ、これら画分は、次いで、さらなるカラムクロマトグラフィ（特にSephadex LH20を用いてメタノール溶出を行う）に供される。その上、所定の画分（特に100 mL）は、再度、回収され、分析される。

【0047】

発明のさらなる実施形態によれば、このカラムから得られたサブ画分4~5（特に120 mg）は、まとめられ、その上、これら原料は、さらなるカラムクロマトグラフィに同じ条件で供され、純粋な（特に白色の）製品が得られる。

40

【0048】

発明の特別な実施形態によれば、上記抽出物は分離され、単離された生成物は、メチル化サイクリトール、3-O-メチル-カイロ-イノシトール、別名(+)-D-ピニトールまたはD-ピニトールとして同定される。

【0049】

さらに、関連するデータの適用を伴う本発明のさらなる実施形態によれば、デスマディウム・アドセンデンス製剤を、所定のフラボノイド・プロファイルを有する本発明の基本的実施形態に従って、さらに特徴付けることが可能である。

【0050】

さらに、MUANDAは、表1で「ケルセチングルコシル」および「ケルセチン二水和

50

物」との用語を使用しつつ、最も重要なフェノール化合物として、「ケルセチン二水和物」を挙げている。ピテキシンおよびその誘導体の存在についても、報告がない。

【0051】

発明の特別な実施形態によれば、基準化された抽出物は、デスモディウム・アドセンデンス由来であり、肝炎、特に肝炎の予防に関する効果の点からD-ピニトールによって定量化されており、D-ピニトールは、デスモディウム・アドセンデンスから単離され、特に化学的、物理的、感染的または免疫的原因による肝臓損傷に対する活性成分となる。

【0052】

一方、国際公開第2004/084875号は、ピニトールまたは肝臓を保護するためのピニトール含有植物抽出物に関する。しかしながら、この文献は、大豆、マツ、ケンボナシ、エゾウコギ、イナゴマメといった植物について言及しているものの、デスモディウム、ましてやデスモディウム・アドセンデンスに関しては言及していない。さらに、この文献は、肝臓保護効果の指標として、SODおよびグルタチオンを挙げている。そのため、ここには、D-ピニトールを含有する植物の抽出物を肝機能保護のために利用することについて、開示がない。肝機能の保護とは、何らかの肝臓疾患を防ぐ何らかの方法を示すものである。ましてや、肝臓疾患を治療する方法や、D-ピニトールまたはこの成分を含む抽出物の使用を伴う外来性、すなわち熱帯性植物についても開示がない。

10

【0053】

さらに、この文献は、低血糖および抗糖尿病活性に関して開示しているが、肝臓保護作用には関連がなく、肝臓疾患の治療とも関連がない。

20

【0054】

本発明はまた、上記方法により得られ、哺乳動物の肝臓保護、すなわち、肝臓疾患の予防に利用される植物抽出物に関する。

【0055】

他のデスモディウム種にピニトールが存在しても、ピニトールの含有量によって特徴づけられたD-アドセンデンスの製剤が肝臓保護作用を有するという知見は、このことが他のデスモディウム種には当てはまらないということを考え合わせれば、些かもその価値を減じられるものではない。しかしながら、本発明によれば、肝炎に対する作用を示すD-ピニトール分子によって定量化され、公知の植物であるデスモディウム・アドセンデンスに由来する基準化された抽出物を調製することが可能になるのは事実である。要するに、デスモディウム・アドセンデンスがここで言及されたものよりも多くの用途に利用されていることは事実であるが、ここで議論されているデスモディウム・アドセンデンスから得られるD-ピニトールの抽出物は、決して知られていない。しかしながら、本発明が解決しようとする範囲は、ある種の効能についての計画的かつ標的化された選択にある。アミノ酸等を含む多数の生成物についての文献がなお存在するが、肝臓疾患に対する活性において明確な役割を果たしている、特定の植物であるD-アドセンデンスにおけるD-ピニトールについての記述は全くなく、示唆もない。さらなる利点として、本発明において、該成分が主要成分として相当量存在し、本発明に従い適切に分離されるということについても、何ら開示も示唆もない。

30

【0056】

発明のさらなる実施形態によれば、上記植物抽出物は、哺乳動物の肝臓疾患、とりわけ化学的に引き起こされる肝臓疾患や、とりわけバクテリアやウイルスによる感染症によって引き起こされる肝臓疾患といった物理的または免疫学的に引き起こされる肝臓疾患と同様の肝臓疾患の治療に利用される。

40

【0057】

発明の特別な実施形態によれば、D-ピニトール含有植物抽出物は、D-ピニトールを含む組成物の形態で哺乳動物に投与される。この組成物は、特に民族薬理学の分野において、定量化されたデスモディウム・アドセンデンスの浸出液およびD-ピニトールの奏する化学的に誘発された肝臓障害に対する抗肝毒性作用を参照しながら、医薬組成物、食品組成物および/または飲料組成物からなる群から選択される。

50

## 【 0 0 5 8 】

本発明の方法のさらなる特徴および特殊性は、さらなる従属請求項に規定される。さらに、本発明の方法の詳細は、添付の図面に示されている発明の方法のいくつかの好ましい代表的な実施形態に関する以下の開示に含まれている。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 5 9 】

【 図 1 】 図 1 は、発明に関する方法を説明するためのフローチャート形式の機能的な作業図である。

【 図 2 】 図 2 は、デスマディウム・アドセンデンスの葉および花の標本見本の写実的な複製である。

【 図 3 】 図 3 は、インスリンシグナル伝達の模式図である。

【 図 4 】 図 4 は、B S T F Aで誘導体化して得られた校正曲線のグラフである。

【 図 5 】 図 5 は、誘導体化から3時間後における、濃度と面積比とのグラフである。

【 図 6 】 図 6 は、誘導体化から6時間後における、濃度と面積比とのグラフである。

【 図 7 】 図 7 は、誘導体化から一晚経過後における、濃度と面積比とのグラフである。

【 図 8 】 図 8 は、加熱ブロックを用いて誘導体化を1時間行った後の、濃度と面積比とのグラフである。

【 図 9 】 図 9 は、加熱ブロックを用いて誘導体化を1時間行った後の、濃度と面積比とのグラフである。

【 図 1 0 】 図 1 0 は、超音波振動槽における、抽出物の試料 1 0 0 m g あたりの D - ピニトール / 内部標準の面積比のグラフである。

【 図 1 1 】 図 1 1 は、超音波振動槽における、抽出物の試料 1 0 0 m g あたりの D - ピニトール / 内部標準の面積比のグラフである。

【 図 1 2 】 図 1 2 は、抽出 / 還流による、加熱振動槽における、抽出物の試料 1 0 0 m g あたりの D - ピニトール / 内部標準の面積比のグラフである。

【 図 1 3 】 図 1 3 は、抽出 / 還流による、加熱振動槽における、抽出物の試料 1 0 0 m g あたりの D - ピニトール / 内部標準の面積比のグラフである。

【 図 1 4 】 図 1 4 は、種々の抽出方法による平均専有面積比のグラフである。

【 図 1 5 】 図 1 5 は、反応特性のグラフである。

【 図 1 6 】 図 1 6 は、誤差の概要を示す干渉のグラフである。

【 図 1 7 】 図 1 7 は、種々の日ごとの単一測定値および平均値のグラフである。

【 図 1 8 】 図 1 8 は、種々の日ごとの単一測定値および平均値のグラフである。

【 図 1 9 】 図 1 9 は、いわゆる標準添加法を実施した後の回収値のグラフである。

【 図 2 0 】 図 2 0 は、いわゆる標準添加法を実施した後の回収値のグラフである。

【 図 2 1 】 図 2 1 は、分ごとの電圧 ( m V ) で示される、内部標準なしの分析の部分クロマトグラムである。

【 図 2 2 】 図 2 2 は、分ごとの電圧 ( m V ) で示される、内部標準ありの分析の部分クロマトグラムである。

【 図 2 3 】 図 2 3 は、分ごとの電圧 ( m V ) で示される、内部標準なしの分析の全クロマトグラムである。

【 図 2 4 】 図 2 4 は、分ごとの電圧 ( m V ) で示される、内部標準ありの分析の全クロマトグラムである。

【 図 2 5 】 図 2 5 は、種々の物質と標準物質であるキシリトールとの質量分析スペクトルであり、特異性の点からの最も強いシグナルに対する相対影響度 ( パーセント ) を示している。

【 図 2 6 】 図 2 6 は、種々の物質と特殊性の点から最も強い信号に対する相対的な影響を示す標準物質であるキシリトールとの質量分析スペクトルである。

【 図 2 7 】 図 2 7 は、種々の物質と、特殊性の点から最も強い信号に対する相対的な影響を示す標準物質であるキシリトールとの質量分析スペクトルである。

【 図 2 8 】 図 2 8 は、種々の物質と、特殊性の点から最も強い信号に対する相対的な影響

10

20

30

40

50

を示す標準物質であるキシリトールとの質量分析スペクトルである。

【図 2 9】図 2 9 は、アセトアミノフェン投与後 4 8 時間における血清 A S T 値を示す。

【図 3 0】図 3 0 は、アセトアミノフェン投与後 4 8 時間における血清 A L T 値を示す。

【図 3 1】図 3 1 は、アセトアミノフェン投与後 7 2 時間における血清 A L T 値を示す。

【図 3 2】図 3 2 は、追加の実験データである。

【図 3 3】図 3 3 は、追加の実験データである。

【図 3 4】図 3 4 は、追加の実験データである。

【図 3 5】図 3 5 は、追加の実験データである。

【図 3 6】図 3 6 は、追加の実験データである。

【図 3 7】図 3 7 は、追加の実験データである。

【図 3 8】図 3 8 は、追加の実験データである。

【図 3 9】図 3 9 は、ピーク A ~ F の U V スペクトルである。

【図 4 0】図 4 0 は、生存割合のグラフである。

【図 4 1】図 4 1 は、追加のクロマトグラフィ・プロファイルである。

【発明を実施するための形態】

【0060】

[ 概要 ]

本発明は、一般に、種々の工程が模式的に記載され、デスマディウム・アドセンデンスの特別な植物抽出物の調製に用いられる方法に関する。デスマディウム・アドセンデンスの地上部および/または地下部は、この生成工程において、出発原料となる。デスマディウム・アドセンデンスは、マメ科のデスマディウム属に属する薬草であり、その断片は、図 2 に示される。デスマディウム・アドセンデンスは、頑健な植物であり、0.5 ~ 1 m の背丈に育ち、丸く毛髪状の、溝のあるツルで伸びる茎を持つ。デスマディウム・アドセンデンスは、三つ葉である。支持小葉は、外端において、有毛から無毛であり、0.5 ~ 1 mm の長さであり、1.5 ~ 3 mm の幅である。デスマディウム・アドセンデンスは、耐寒性である。葉柄は、有毛であり、1 ~ 3 cm の長さである。葉は、楕円形から逆卵状であり、丸まった端部を有し、先端が扇形であり、基端部が楔形に丸まっている。葉は、主として表面が無毛であり、裏面に多くの毛が生えている。

【0061】

開花の様式としては、軸上であり、端部に房をつける。葉柄は、溝があり、細い毛が大量に生えている。最初の包葉は、先端が尖った幅広の卵形であり、3.5 ~ 5 mm の長さであり、1.5 ~ 2 mm の幅である。花茎は、葉柄と同様に毛が生えており、0.4 ~ 1.7 cm の長さである。花弁は、ほぼ対となっている。花冠は、萼よりも大きく、楕円形である。果実は、0.5 ~ 2 mm の長さであり 1 ~ 5 の部分からなる幅広の花梗を有し、3.5 ~ 5.5 mm x 2.5 ~ 3 mm の斜めに延びている。種子は、横方向の楕円形であり、2.5 ~ 5 mm の長さであり、1.5 mm の幅である。

【0062】

デスマディウム・アドセンデンスは、いくつかの薬効を示す。神経薬理学の分野において、デスマディウム・アドセンデンスの抽出物は、中枢神経系の抑制作用を示す。エタノール性の抽出物は、鎮痛作用および体温下降作用を示し、強直間代性発作の発生を阻害する。

【0063】

この植物の水性およびエタノール性抽出物は、筋肉のなめらかな収縮を抑制し、肺におけるなめらかな筋肉細胞を活性化する物質の放出を抑制する。抽出物の種々の画分が研究された。あるサブ画分は、ホスホリパーゼの阻害により抗原によって誘起され、カルシウム活性化型のカリウム受容体の活性化によって起こる筋肉細胞のなめらかな収縮を抑制する。この画分には、サポニンが存在する。さらに、テトラヒドロイソキノリン類似体を含む画分は、エポキシおよびハイドロキシエイコサノイドを生成するチトクロム P 4 5 0 N A D P H 依存型モノオキシゲナーゼ反応を抑制する。この画分は、C O X 活性を増加させ、プロスタグランジン産生が増加することとなる。

## 【 0 0 6 4 】

実験フェーズにおいて、第一に、多くの試験がインビトロで実施され、次いで、さらなる試験がインビボで実施された。以下に示された試験の結果は、図 1 のフローチャートに模式的に示される。

## 【 0 0 6 5 】

ガーナのデスモディウム・アドセンデンス植物の原料およびその抽出物に関する植物化学の研究によれば、乾燥され、微粉化された  $5 \times 200 \text{ g}$  の葉を  $3 \text{ l}$  の蒸留水で 1 時間煮沸することにより水性浸出液が調製された。冷却後、一部はまとめられ、濾過された。濾液が、真空下で濃縮され、次いで、凍結乾燥された。  $1 \text{ kg}$  の乾燥した葉から出発して、約  $65 \text{ g}$  の乾燥した浸出液が一般的に得られた。

10

## 【 0 0 6 6 】

次いで、  $20 \text{ g}$  の浸出液は、Sephadex LH-20 ( $120 \times 4 \text{ cm}$ ) によるメタノール溶出でのカラムクロマトグラフィに供された。  $100 \text{ ml}$  の画分が回収され、薄層クロマトグラフィ (シリカゲル、Merck、移動相が  $\text{MeOH} / \text{H}_2\text{O}$  :  $5 : 1$  で層厚が約  $0.25 \text{ cm}$ ) によって分析された。UV 光、とりわけ波長  $366 \text{ nm}$  以下の UV 光の下でスポットが検出された。アニスアルデヒド /  $1\% \text{ H}_2\text{SO}_4$  のメタノール溶液を噴霧した後、プレートは、着色されたスポットを得るために  $120^\circ \text{C}$  で 10 分間加熱された。画分は、クロマトグラフパターンに基づいてまとめられ、11 のサブ画分とされた。サブ画分 5 ~ 11 ( $200 \text{ mg}$ ) は、緑色のスポットを示し、これらはプールされた。この画分は、Sephadex LH-20 ( $60 \times 3 \text{ cm}$ ) によるメタノール溶出でのカラムクロマトグラフィにさらに供され、  $100 \text{ ml}$  の画分は、再度回収され、同じ条件下、新たなカラムクロマトグラフィに供し、結晶性の生成物が得られた。

20

## 【 0 0 6 7 】

$^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  NMR、質量分析および比旋光度測定を行う分光試験による構造解明フェーズの結果、単離された生成物、すなわち、(+) ピニトールまたは D - ピニトールとしても知られるメチル化サイクリトール、3 - O - メチル - カイロ - イノシトールが同定された。

## 【 0 0 6 8 】

$0.5$  および  $1 \text{ mM}$  の D - ピニトールによる 3T3 - L1 脂肪細胞の処理は、グルコース輸送体 (GLUT4)、インスリン受容体基質 (IRS)、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR) および CCAAT / エンハンサー結合タンパク質 (CEBP) の mRNA 発現を増大させる。  $1 \text{ mM}$  の D - ピニトールは、アディポネクチン mRNA、抗炎症性、抗糖尿病性およびアテローム産生抑制性のアディポサイトカインの発現を増大させ、この発現は、インスリンによっても増大する。多くの因子の増大された発現は、D - ピニトールのインスリン様特性によって説明され得る。

30

## 【 0 0 6 9 】

L6 ラット筋肉細胞において、D - ピニトールは、インスリンと同様に、細胞膜への GLUT4 の移行を引き起こし、グルコースを摂取する準備を行う。図 3 参照。

## 【 0 0 7 0 】

アテローム産生抑制性活性について、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-1 $\beta$  および IL-8 といったサイトカインの分泌および発現を減らし、マクロファージスカベンジャー受容体、CD36 および CD86 の発現を減らすことにより、D - ピニトールは、泡沫細胞の形成を適度に減らす。D - ピニトールのインスリン様作用は、おそらくこれが原因である。

40

## 【 0 0 7 1 】

免疫システムにおける効果について、D - ピニトールは、インビトロおよびインビボのそれぞれにおいて、免疫薬理学的な特性を有し、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ活性および NF- $\kappa$ B の移送を抑制することにより、MHC-1、MHC-II、および、CD80 や CD86 といった共刺激分子の発現を減らし、IL-12 および、LPS 起因性の樹状骨髄細胞における炎症誘発性サイトカインの大量産生を減らすことが発見

50



された。これにより、これら細胞の成熟が抑制される。D - ビニトールによる樹状細胞の処理は、これら細胞が正常な細胞性免疫応答を誘発することを防ぎ、L P S 刺激性の樹状細胞がD - ビニトールによって処理されると、T細胞の増殖および、C D 4 + 細胞によるI N F - の産生が、否定的な影響を受ける。好中球において、D - ビニトールは、T N F - の発現を阻害する。

#### 【 0 0 7 2 】

D - ビニトールは、投与量依存性的および時間依存的に、常時発現のおよび誘起されたN F - k B 活性を抑制する。抑制は細胞特異的ではなく、I K K 活性、I k B a の分解およびリン酸化、p 6 5 の核リン酸化反応および移行を抑制することによって起こる。D - ビニトールはまた、細胞増殖、抗アポトーシス、侵襲および血管新生に関する、N F - k B 依存性レポーター遺伝子の発現を減らし、N F - k B 依存性遺伝子生成物を抑制する。このことは、なぜアゾールヌクレオシド類似体といったD - ビニトールの類似体が抗腫瘍特性を有するかを説明し得る。アミノサイクリトールといったD - ビニトールの他の誘導体は、グリコシダーゼを抑制する。

10

#### 【 0 0 7 3 】

試験動物におけるインビボの薬理特性が研究された。インビボで実施された試験では、肝臓に損傷を与え、その予防および/または治療効果が研究された。それまでに、当該分子の予防特性はよく知られていたが、当該分子が治療作用を有することは証明されていなかった。糖尿病のマウスおよびラットにおける作用に加え、ストレプトゾトシン誘発性糖尿病マウスにおいて、D - ビニトールは、急性および慢性の血糖低下作用を示し、インスリンシグナル伝達に介入することによって、L 6 筋肉細胞における2 - デオキシグルコースの基礎的摂取を増やす。D - ビニトールは、深刻なインスリン抵抗性マウスに対しては効果的でない。ストレプトゾトシン誘発性糖尿病マウスにおいて、D - ビニトールは、血中グルコースヘモグロビンを低下させ、インスリンを増加させる。一方で、D - ビニトールは、また、肝臓におけるアスパラギン酸アミノ基転移酵素 ( A S T )、アラニンアミノ基転移酵素 ( A L T ) およびアルカリホスファターゼ値を正常化し、脂質低下作用を示す。抗酸化作用は、脂質の過酸化およびヒドロ過酸化、非酵素の抗酸化剤の増加、および酵素の抗酸化剤、すなわちスーパーオキシドジスムターゼ ( S O D )、グルタチオンパーオキシダーゼ ( G P )、カタラーゼおよびグルタチオン - S - トランスフェラーゼ ( G S T ) の正常化によって証明される。

20

30

#### 【 0 0 7 4 】

肝臓保護作用に関する限り、この物質は、ガラクトサミンにより肝臓損傷が誘発された後の、アスパラギン酸アミノ基転移酵素 ( A S T ) およびアラニンアミノ基転移酵素 ( A L T ) による肝臓値およびT N F - 値を正常化する。さらに、D - ビニトールは、脂質過酸化を減らし、グルタチオン、グルタチオンリダクターゼおよびグルタチオンパーオキシダーゼ値を正常化する。

#### 【 0 0 7 5 】

D - ビニトールは、抗炎症効果も有する。ラットにおける研究において、D - ビニトールは、それぞれ急性 ( 足のカラギーナン誘発性浮腫 ) および亜急性 ( コットン・ペレット肉芽腫 ) 炎症に対する抗炎症特性を有した。この物質は、駆虫活性を有する。

40

#### 【 0 0 7 6 】

免疫システムにおける効果に関し、D - ビニトールは、O V A 起因性喘息のマウスにおいて、気管支肺胞洗浄液中の多くの炎症細胞を減少させ、細気管支周囲および血管周囲領域へのこれら細胞の侵襲を減らす。したがって、肺における炎症に有効である。I L - 4、I L - 5 およびエオタキシンといったT h 2 サイトカインは、D - ビニトールの摂取により減少し、I N F - といったT h 1 サイトカインは、I N F - 陽性C D 4 細胞が行うのと同じように、増加する。T h 1 / T h 2 のバランスはまた、D - ビニトールによって、増大されたT h 1 転写因子T - b e t の発現、およびT h 2 の病理において上昇するT h 2 転写因子G A T A - 3 が減少することによって、修正される。血液から組織への炎症細胞の移行に重要である、肺組織におけるM M P - 9 のゼラチン分解作用は、減らされ

50

る。したがって、D - ピニトールは、喘息において見られる過反応および炎症を抑える。

【 0 0 7 7 】

[ ヒトにおける研究 ]

2 型糖尿病患者において、D - ピニトールは、空腹時血糖値、H b A 1 c 値およびインスリンに関する有利な効果を示す。1 日あたり  $2 \times 60 \text{ mg}$  の D - ピニトールにより 13 週間処置したところ、H D L コレステロール値が増加した一方、総コレステロール、L D L / H D L 割合、および、収縮期および拡張期血圧は減少した。管理不能の 2 型糖尿病患者において、通常の治療に加え、 $20 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$  となるよう D - ピニトールで処置したところ、空腹時および食後血糖値が H b A 1 c と同様に改善されたものの、アディポネクチン、レプチン、C 反応性タンパク質 ( C R P ) および遊離脂肪酸のレベルは有意に変化しなかった。D - ピニトールをより短い 4 週間の期間、 $20 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$  で投与した場合、この物質は、インスリン耐性患者において、基礎的およびインスリン介在性のグルコース代謝若しくは脂質代謝に対して、効果を示さなかった。糖尿病でない高齢の患者では、6 週間の D - ピニトールの摂取は、インスリン介在性グルコース代謝に効果を示さなかった。

10

【 0 0 7 8 】

D ・アドセンデンス浸出液中の D - ピニトールに対する分析方法の発展を、関連するバリデーションとともに以下に示す。基準化された製剤が植物原料から製造される以前においては、植物中の活性物質の濃度が知られていなければならない。この目的において、再現性のある、正確な、手間のかからない、そしてまた好ましくは経済的な、標準的方法が、利用される。この主研究の目的は、D ・アドセンデンスの浸出液中の D - ピニトールの含有量を決定するための分析方法を開発することである。この目的において、分析技術 ( G C 、 H P L C 、 T L C ) 、カラム、検出器および光学精製方法といった種々のパラメータが調査された。いったん可能な方法が開発されると、その方法はまた、I C H スタンドアードに沿ってバリデートされるべきである。したがって、線形性、範囲、再現性、正確性および特異性が調査されることとなる。

20

【 0 0 7 9 】

選択された原料は以下のものを含む：分析用品質を備えた H P L C グレードのメタノール、ピリジン ( 99 + % ) 、 B S T F A 1 % T M C S 、標準物質 D - ピニトール ( 95 % ) 、キシリトール ( 99 % 以上 ) およびダルシトール ( 99 + % ) 、マンニトール p . a . およびソルビトール、および、ヘリウム、水素ガスおよび空気、塩化ナトリウム ( p . a . ) 、 D ( + ) - ガラクトサミン塩酸塩 ( 99 % 以上 ) およびシリマリン。

30

【 0 0 8 0 】

デスマディウム・アドセンデンスの浸出液は、以下の手順に沿って調製された。200 g の植物原料に、3 リットルの精製水が添加された。全物質は 1 時間煮沸され、その後、冷却され、濾過された。R o t a v a p o r を用いて乾燥することにより、体積を減じた。最終段階として、浸出液は凍結乾燥された。

【 0 0 8 1 】

薄層クロマトグラフィ技術において、固定相は、樹脂またはガラス製の土台に設置される。固定相は、シリカゲルまたは改質シリカであってよく、酸化アルミニウム、セルロースまたは珪藻土であってよい。

40

【 0 0 8 2 】

分析される  $1 \sim 10 \mu \text{ l}$  の溶液は、プレートの底縁から約  $1.5 \text{ cm}$  の位置にスポットされる。次いで、プレートは、約  $1 \text{ cm}$  の移動相の層が入れられた展開タンク中に配置される。移動相は、毛管力によって上昇し、溶液中の物質は、そのタイプによって、素早くまたはゆっくりと流される。液体の先端がほぼ頂端に到達すると、プレートは、展開タンクから取り出され、移動相が留去される。こうして、U V 光を使用するか、スプレー試薬で処理することにより、スポットパターンを可視化することができ、保持時間を算出することができる。濃度計を用いて定性的測定を行うことができる。この濃度計は、スポットの強度を測定し、測定した強度を濃度図 ( デンシトグラム ) に変換するものである。

50

## 【 0 0 8 3 】

実験には、シリカゲル F<sub>254</sub> シリカゲル T L C - プレート、L i c h r o s p h e r シリカゲル F<sub>254</sub> H P T L C - プレートおよびシリカゲル 6 0 R P - 1 8 F<sub>254</sub> プレートが使用された。

## 【 0 0 8 4 】

ガスクロマトグラフィ G C は、液体固定相とガス移動相との間での分配により分析物（アナライト）を分離する分析技術である。インジェクションブロック内が高温であるため、インジェクションの間に、溶媒およびアナライトはいずれも蒸発し、冷却カラム上で凝縮する。カラム温度が高まると、相対的に揮発性の高くないアナライトもまた、ガス層に進入し、最終的には検出器に到達する。アナライトがより非極性で、より揮発性であればあるほど、ガス層に対するより高い親和性を示し、保持時間が短くなる。より極性が大きい、または、揮発性の低いアナライトは、より極性の高い固定相に、より親和性を示し、検出器に到達するのが遅くなる。使用できる検出器としては、水素炎イオン化検出器、電子捕獲検出器、窒素リン検出器、ヘリウム計、硫黄検出器、および質量分析計が挙げられる。

10

## 【 0 0 8 5 】

これらの実験には、F I D 検出器を備える T r a c e G C U l t r a 型の G C - F I D が使用された。特異性を確認するには、V o y a g e r E I M S 検出器を備える T r a c e 2 0 0 0 G C 型の G C - M S が使用された。

## 【 0 0 8 6 】

水素炎イオン化検出器（F I D）および質量分析計（M S）は、これら実験で使用された。水素炎イオン化検出器は、普遍的かつ高感度の検出器である。溶出液は、H<sub>2</sub>および空気と混合され、燃焼される。その結果、有機化合物は、イオン化し、イオンは、定電圧の集電極に関連する電流の強度を増加させる。質量分析計は、分子のイオン化によって働き、その後、イオンが測定される。

20

## 【 0 0 8 7 】

液体クロマトグラフィは、さらなる分析技術であり、分離は、固定相と液体移動相との分布の違いに基づいて起こる。固定相が移動相よりも極性が大きい場合、「順相クロマトグラフィ」との用語が使用され、一方、固定相が非極性である場合、「逆相クロマトグラフィ」との用語が適用される。アナライトは、溶離液で溶出され、その組成や極性はアナライトをより素早くまたはよりゆっくりと溶出するように調整することができる。使用できる検出器としては、U V 検出器、R I 検出器、電流滴定検出器、質量分析計および蒸発光散乱検出器（E L S D）が挙げられる。

30

## 【 0 0 8 8 】

これらの実験には、E L S D を使用した。移動相の留去後、光散乱を測定し、電気信号に変換した。

## 【 0 0 8 9 】

サイクリトールといった糖アルコールを含む、糖および糖誘導体を分析し得る分析方法が知られている。定量には、いくつかの技術が利用可能であり、これらの概要が以下に示される。

40

## 【 0 0 9 0 】

たとえば、G C の技術に関して、糖および糖誘導体は揮発しないため、誘導体化のステップもまた、ここに追加されなければならない。トリメチルシリル化反応およびアセチル化反応のいずれも、知られている。一般的な水素炎イオン化検出器および質量分析計のいずれも、検出器として使用され得る。

## 【 0 0 9 1 】

さらに、H P L C の技術に関して、アナライトが U V 活性でないため、U V 検出が行われる前に、これらは誘導体化されなければならない。U V 活性物質は、その他のものと同様に、塩化ベンジルの誘導体化、または、U V 活性を有するイオン対試薬を用いることによって調製される。U V 検出に加え、誘導体化を行わない、屈折率検出、アンペロメトリ

50

ック電気化学検出、質量分析、電子光散乱検出が使用されてもよい。C<sub>18</sub>カラムおよびアニオン交換カラムのいずれも、使用され得る。アニオン交換樹脂が使用される場合、糖は、塩基の働きに助けられ、アニオンに変換される。

【0092】

その他の技術として、酵素分析法、キャピラリ電気泳動および薄層クロマトグラフィ-濃度測定法が使用可能である。TLC法が高速かつ比較的安価であるため、Pothierによって説明されたフィンガープリントを行う薄層クロマトグラフィにおいて、浸出液中の他の物質からD-ピニトールを単離することも試みられた。

【0093】

D-ピニトール(標準物質)および試料は、蒸留水および50%メタノール-50%水に溶解された。使用された移動相は、酢酸エチル-ギ酸-酢酸-水(67.5:7.5:7.5:17.5)、クロロホルム-メタノール-水(54.5:36.5:9)、クロロホルム-メタノール-水(55:36:9)、クロロホルム-メタノール-水(46.5:46.5:7)およびクロロホルム-メタノール-水(33:53.5:13.5)であった。

10

【0094】

D-ピニトールは、UV光の下、UV指示薬であるF<sub>254s</sub>ではプレート上に確認することはできず、たとえ非常に高い濃度(10mg/ml)でも同じであった。一方、スプレー試薬としてアニスアルデヒドまたはチモールを使用した場合、標準物質についてはいくつかのスポットが観察された。

20

【0095】

したがって、異なる分析技術を利用する方法を開発する決定がなされた。D-ピニトールの分析については相当な数のGC法が文献に記載されていたこと、および、ガスクロマトグラフィは誘導体化HPLCよりも高感度の技術であったことから、GC法を開発する決定がなされた。

【0096】

HPLC-ELSDを使用したソバ中のD-カイロ-イノシトールの定量分析に基づき、ガスクロマトグラフィ法と同様に、液体クロマトグラフィ法を開発する試みがされた。初期の実験では、再現性が非常に低いことが示された。そのため、この方法は、さらに最適化されることはなかった。

30

【0097】

したがって、ガスクロマトグラフィに対する直接の変更がされた。糖および糖誘導体の分析のために、種々のカラムを使用し得ることが知られている。以下の表には、これらカラムのうちのいくつかの概要が示されている。

【0098】

【表 1】

表 1

	アルキルシリコーン	
単純非極性	100%メチルポリシロキサン	沙棘に含まれるイノシトール、 メチルイノシトール
	アルキルフェニルシリコーン	
DB-5MS	5%フェニルポリシルフェニレンシロキサン	環境サンプル中の糖
SPB-20	20%フェニル 80%メチルポリシロキサン	イノシトールの異性体および 尿中のアラビトール
ID.BP×5	5%フェニル 95%メチルポリシロキサン	レンギョウの葉中の糖
	シアノアルキルシリコーン	
SPB-1701	14%シアノプロピルフェニル 84%メチルシ ロキサン	尿中のポリオール
DB-225	50%シアノプロピルフェニル 50%メチルシ ロキサン	D. ミクロカルプム中の炭化水素
	充填カラム	
OV-17		大豆中のピニトール
OV-17(3%)		大豆中の炭化水素

## 【0099】

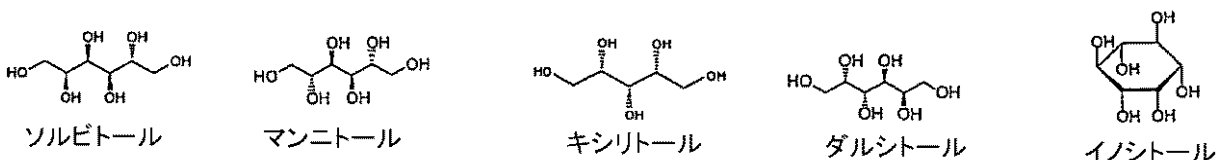
A11tech型の、十分に普及した、DB-5およびHP-5（5%フェニル-95%メチルポリシロキサン）カラムならびにAT<sup>TM</sup>-5MS/RTX-5MS（5%フェニルポリシルフェニレンシロキサン）カラムおよび、Restek型の、非極性の固定相を有する、AT<sup>TM</sup>-1/RTX-1（100%メチルポリシロキサン）カラムが使用された。浸出液は、水中で植物を煮沸することにより得られ、そのため、主として極性物質を含んでおり、アナライトは、100%メチルポリシロキサンカラムよりも5%フェニル-95%メチルポリシロキサンカラムに対してより強い保持力を有し、よりよい分離を行い得ると予想された。したがって、HP-5カラムは、浸出液の分析のために、AT<sup>TM</sup>-1/RTX-1カラムに代えて選択された。固定相としてシアノアルキルシリコンを備えるカラムは、AT<sup>TM</sup>-264であり、6%シアノプロピルフェニルと94%メチルシロキサンとからなる。

## 【0100】

内部標準もまた、決定されなければならない。ここではガスクロマトグラフィが使用されるため、内部標準は、インジェクションにおける変化を正すために添加されなければならない。内部標準は、分析される物質と同様に振る舞わなければならない。そのため、D-ピニトールの構造と同様の構造を有する入手可能ないくつかの物質、すなわち以下に示されるソルビトール、マンニトール、ダルシトールおよびイノシトールといった糖アルコールを使用することが選択された。

## 【0101】

## 【化3】



10

20

30

40

50

## 【 0 1 0 2 】

しかしながら、ラクトースといった単糖類は、アノマー化のためにクロマトグラム中で2つのピークを示すため、選択しなかった。アノマー化は、内部標準との干渉の機会を増加させる。言い換えると、内部標準のピークと、試料のピークとが重複する機会を増加させる。二糖類の場合はいつも、管理することが困難であり、かつ、定量分析において望ましくない分解が起こる機会がある。D - ピニトールと比べて高分子量である糖または糖誘導体は、遅く溶出されるため、分析時間を長くする。そのため、この化合物もまた、選択されなかった。

## 【 0 1 0 3 】

選択された5つの糖アルコールのうち、ダルシトールおよびイノシトールは、水には溶解するが、メタノールに溶解しにくい。水は、微量であっても、TMS誘導体の分解を起こし得るため、定量分析に役立たない。よって、これら物質は第一選択にはならない。また、水はメタノールよりも乾燥のための蒸発に長い時間を要するという点も、他の利点として挙げられる。さらに、非常に少量の、すなわち微量の水は裸眼では見えないので、乾燥剤を使用すべきである。そして、分析における、この物質の影響もまた、測定されなければならない。

## 【 0 1 0 4 】

以下の表2に明示されるように、マンニトール、ソルビトールおよびキシリトールは、メタノールに溶解し得るが、マンニトールおよびソルビトールの保持時間は、試料中に含まれる、これら以外の不明成分と重複する。キシリトールは、クロマトグラム中で他の物質が溶出しないうちに溶出し、ノイズが見られるのみである。構造に関してもまた、キシリトールは、D - ピニトールと同じ数の水酸基を含んでいるため、マンニトールまたはソルビトールよりもよい選択である。このことは、誘導体化反応が水酸基上で起こることから、重要である。以下の表2には、使用可能な内部標準の保持時間の概要が含まれる。

## 【 0 1 0 5 】

## 【表2】

表 2

	保持時間	
ダルシトール	24,66	
イノシトール	24,96	26,82
マンニトール	24,46	
ソルビトール	24,57	
キシリトール	20,77	

## 【 0 1 0 6 】

誘導体化が考慮される限りにおいて、糖誘導体は、アセチル化またはシリル化によって、揮発性の誘導体に誘導体化され得る。文献では、ピリジンに含まれるBSTFA + TMCs、HMDs + TFA、ピリジンに含まれるHMDs + TMCs、STOX + HMDs + TFA、TMS1 + ピリジン、無水酢酸+ピリジン、AcO - N - メチルイミダゾールを含む種々の試薬が使用されている。すべての可能性において、無水酢酸とピリジンによるアセチル化、および、BSTFA + 1 % TMCs ( + ピリジン ) によるシリル化を行うことが決定され、結果が比較された。

## 【 0 1 0 7 】

アセチル化は、2 : 1の割合の、無水酢酸およびピリジンにより実行された。誘導体混

合物は、検量された、固体の D - ピニトールに添加され、ソルビトールは、内部標準として添加された。この工程において D - ピニトールが溶解され得るよう、誘導体混合物の正確な体積を調べる必要があった。混合物は、60 のオープンで30分間加熱されるか、そのバイアルが室温で一晩保管された。誘導体化の後、試料は、窒素蒸気の下で、乾燥するまで蒸発させられた。誘導体は、エチル酢酸に再溶解され、分析された。この目的において、AT<sup>TM</sup> - 264 カラムが使用された。アセチル化誘導体 (Ac20 - N - メチルイミダゾール) の分析のために DB - 225 カラムを用いた文献と同様に、DB - 225 カラムが使用された。オープンの温度は200 であり、5 / 分で220 まで加熱され、20分間保持された。

【0108】

10

ピークは、保持時間に関して非常に優れた変動を示した。ピークエリアの再現性は、所望の結果を残した。誘導体は、5つの水酸基が誘導体化されなければならなかったため、関連する観点からは十分に揮発性ではなかったというのが、可能性のある一つの説明である。

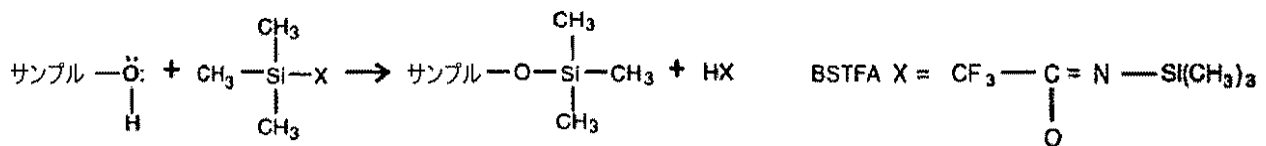
【0109】

トリメチルシリル化がされる場合、D - ピニトールとソルビトールが計量され、2 ml のメタノールに溶解された。ソルビトールは、第1の誘導体化実験に使用され、次いで、その後、上記した内部標準が選択された。100 μl のBSTFA + 1% TMS C と、40 μl のピリジンが添加され、窒素蒸気下で、100 μl が蒸発された。バイアルは、70 のオープンに3時間保持された。次いで、誘導体化試薬は、乾燥除去され、残渣が300 μl のヘキサンに再溶解された。それぞれのレベルについて、計量は1回、誘導体化は2回、インジェクションは3回行った。BSTFAを用いる、水酸基を含む物質の誘導体化反応が、以下に示される。

20

【0110】

【化4】



30

【0111】

以下の表3は、濃縮率およびD - ピニトール / 内部標準の面積率の概要を示している。

【0112】

【表3】

表 3

濃度割合	面積比
0,29	0,25
0,96	0,83
1,74	1,38

40

【0113】

図4は、BSTFAを用いた誘導体化反応によって得られた直線状の校正曲線を示している。一見すると、この方法は、線形であり、保持時間もまた同じままであると思われる。最初の実験結果から、誘導体化方法は、アセチル化よりも成功したと決定することができた。したがって、この誘導体化方法は、さらに利用された。次いで、内部標準として選択されたキシリトールを用いた誘導体化がさらに着目された。さらに、反応時間が面積に

50

何らかの変化を生じさせるのかどうか決定された。「25 mg / 50 ml」および「10 mg / 50 ml」のD-ピニトールとキシリトールとのメタノール性溶液が、それぞれバッチごとに調製された。10 ml のメスフラスコに、2 ml の内部標準溶液が入れられ、種々の分量のD-ピニトールが添加された。次いで、これらは希釈された。この溶液500 ml が、窒素蒸気下で乾燥された。次いで、0.1 ml の誘導体混合物が、それぞれのバイアルに添加され、それぞれのバイアルは、70 のオープンに、3時間、6時間、一晩入れられた。次いで、誘導体化試薬が乾燥除去され、残渣が300 µl のヘキサンに再溶解され、GC に2回インジェクションされた。

【0114】

以下の表4は、3時間の誘導体化後の、直線性を示す濃縮率および面積比の概要を示している。

10

【0115】

【表4】

表 4

ISに対するD-ピニトールIの濃度	ISシリーズ1に対するD-ピニトールIの面積	ISシリーズ2に対するD-ピニトールIの面積
0,741	0,746	0,870
1,185	1,324	1,292
1,481	1,318	1,302
1,778	1,654	1,595
2,074	1,862	2,059
2,370	2,084	2,198
2,951	2,892	3,550

20

【0116】

【表5】

表 5

ISに対するD-ピニトールIの濃度	ISシリーズ1に対するD-ピニトールIの面積	ISシリーズ2に対するD-ピニトールIの面積
0,741	1,374	1,303
1,185	1,041	1,212
1,481	1,356	1,498
1,778	1,676	1,723
2,074	1,905	2,263
2,370	2,106	2,920
2,951	2,849	2,599

30

40

【0117】

図5は、誘導体化から3時間後における、濃度と面積比とのグラフである。

【0118】

上記表5は、誘導体化から6時間後における、濃度と面積比との概要を示しており、一方、図6は、誘導体化から6時間後における、濃度と面積比とのグラフである。

【0119】

以下の表6は、誘導体化から一晩経過後における、濃度と面積比との概要を示しており、一方、図7は、誘導体化から一晩経過後における、濃度と面積比とのグラフである。

【0120】

50



【表 6】

表 6

ISに対するD-ピニトールIの濃度	ISシリーズ1に対するD-ピニトールIの面積	ISシリーズ2に対するD-ピニトールIの面積
0,741	—	0,840
1,185	1,200	0,977
1,481	1,353	1,432
1,778	2,407	1,671
2,074	1,905	1,916
2,370	2,215	2,232
2,951	2,718	2,647

10

## 【0121】

図5～7および上記3つの表から明らかとなり、同じ濃度点で、誘導体化時間に関係なく、優れた相互変動性が見られた。誘導体化反応の完結性の点からは、何ら結論は得られなかった。他の問題は、試料がオープンに一晩置かれる場合、いくつかのバイアルが朝には空になっており、誘導体化試薬が明らかに乾燥したことである。このことも、定量測定にとっては望ましくない。実際的には、試料を6時間誘導体化することは、極めて難しい。

20

## 【0122】

次いで、これを避けるために、加熱ブロックを使用することが選択された。熱をよく伝導する反応バイアルもまた、使用された。この方法では、1時間の誘導体化で充分なはずである。それぞれ12.5mg/100mlおよび10mg/50mlの分量のD-ピニトールとキシリトールの溶液から、2mlの内部標準および異なる分量のD-ピニトールが10mlのメスフラスコに移され、希釈された。この溶液50μlが、窒素蒸気下で乾燥された。50μlの誘導体混合物が、それぞれのバイアルに添加され、それぞれのバイアルは、70℃の加熱ブロックに、1時間入れられた。次いで、100μlのヘキサンが添加され、ボルテックスされ、GCに2回インジェクションされた。以下の表7は、加熱ブロックを用いて誘導体化を1時間行った後の、濃度と面積比との概要を示しており、図8は、それを示すグラフである。

30

## 【0123】

## 【表 7】

表 7

ISに対するD-ピニトールIの濃度	ISシリーズ1に対するD-ピニトールIの面積	ISに対するD-ピニトールIの面積
0,741	0,658	0,681
1,185	1,039	1,040
1,481	1,299	1,297
1,778	1,559	1,567
2,074	1,840	1,832
2,370	2,099	2,099
2,951	2,508	—

40

## 【0124】

【表 8】

表 8

ISに対するD-ピニトールIの濃度	ISシリーズ1に対するD-ピニトールIの面積	ISシリーズ2に対するD-ピニトールIの面積
0,408	0,345	0,349
0,653	0,551	0,551
0,817	0,690	0,690
0,980	0,825	0,826
1,144	0,963	0,966
1,307	1,096	1,095
1,634	1,365	1,368

10

## 【0125】

その後の実験において、誘導体化反応が完了した後、より高濃度のキシリトールが使用されたが、ヘキサンはさらに添加されることはなかった。このようにして、分析方法における追加のステップを避けることができた。上記表8は、加熱ブロックを用いて誘導体化を1時間行った後の、濃度と面積比との概要を示している。

## 【0126】

20

誘導体化反応が反応バイアルおよび熱い加熱ブロックで行われる場合、校正曲線上のポイント間で異常値はもはや存在しない。したがって、オープンを使用する場合と比較して明確な差が見られる。2つの図を比べると、この方法においてヘキサンを添加することは、大きな影響があると思われる。にもかかわらず、このステップは、不必要に溶媒を使用せず、また大きな労力を要さない分析手法とするために、省略することが選択された。

## 【0127】

抽出：定量的な実施のためには、試料の抽出もまた、完遂されなければならない。以下の実験では、最適な抽出方法が追及された。

## 【0128】

30

最初の実験では、超音波振動槽を用いた抽出が行われた。それぞれの場合において、この目的のため、約100mgの試料が量り取られた。この場合、内部標準であるキシリトール2mL(18mg/50mL)が添加され、メタノールによって10mLに希釈された。この50μLが留去・乾燥され、誘導体化され、GCにインジェクションされた。以下の表は、2回、3回または4回抽出に対しての、および、より大きな容量を用いた場合におけるD-ピニトール/キシリトールの面積比の概要を示している。以下の表9は、超音波振動槽で種々の数の抽出を行った後の、試料100mgあたりのD-ピニトール/内部標準の面積比の概要であり、図10は、そのグラフであり、1は2回抽出、2は10mLに対して20mLで2回抽出、3は3回抽出、4は4回抽出を行った場合をそれぞれ示している。

## 【0129】

40

【表 9】

表 9

	2回抽出	2回抽出 (20ml)	3回抽出	4回抽出
1	0,592	0,623	0,640	0,689
2	0,588	0,631	0,659	0,683
平均	0,590	0,627	0,650	0,686

10

## 【0130】

上記表および図10から、2回または3回の抽出サイクル後であっても、抽出がいまだ完了しないことが分かるであろう。4回のサイクルの後に抽出が完了するかどうかを見極めるために、5回目のサイクルを行うことが必要であろう。この作業は、過剰な労力を要するため、さらなる研究は、この物質がどのようにしたら最も抽出されるかに移された。体積をより大きくすることも、役割を果たす。体積が2倍になると、面積比も同様に増加する。

20

## 【0131】

次の実験において、試料は、上記した同様の内部標準とともに、50mlおよび100mlのメタノールに溶解された。試料には、超音波振動槽で30分または1時間、振動が与えられた。次いで、所定量が留去・乾燥され、誘導体化され、分析された。以下の表10に、超音波振動槽における種々の抽出サイクル後の、試料100mlのD-ピニトール/内部標準の面積比を集約したデータが示される。

## 【0132】

## 【表10】

表 10

	50ml - 30分	100ml - 30分	50ml - 1時間	100ml - 1時間
1	0,488	0,492	0,627	0,620
2	0,530	0,535	0,542	0,568
平均	0,509	0,514	0,585	0,594

30

40

## 【0133】

図11は、これを表すグラフであり、それぞれ、1は50ml - 30分、2は50ml - 1時間、3は100ml - 30分、4は100ml - 1時間を表している。

## 【0134】

50mlの体積のものに着目すると、該体積が増加しても面積比がさらに増加することはない。しかしながら、30分または1時間抽出する場合には、表10および図11に示されるよう、大きな相違がある。それでも、このような方法による場合でも、面積比はなお100mlメタノール中で4回抽出後よりも低いため、抽出はいまだ完了していない。

## 【0135】

50

上記実験から明らかなように、第 1 に、抽出回数に対する時間は、重要な要因である。しかしながら、試料が振動槽にあるときは、これもまた加熱されるため、熱要因についても追跡されるべきである。以下の表 11 は、加熱された超音波振動槽において、種々の抽出サイクル後の、試料 100 mg あたりの D - ピニトール / 内部標準の面積比の概要である。

【0136】

【表 11】

表 11

	1回抽出	2回抽出	3回抽出	4回抽出
1	0,634	0,670	0,646	0,670
2	0,631	0,702	0,716	0,716
平均	0,632	0,686	0,681	0,693

10

【0137】

図 10 は、このグラフであり、それぞれ 1 は 1 回抽出、2 は 2 回抽出、3 は 3 回抽出、4 は 4 回抽出を示している。

20

【0138】

平均的には、加熱された振動槽における抽出では、2 回抽出後に最大収率となる。1、3 または 4 回抽出サイクル後では、面積比はそれ以上増えない。加熱された超音波振動による 2 サイクル後の面積比は、表 11 および図 11 に基づいて予期したであろうとおり、加熱せずに 1 回 1 時間の抽出を行った後のものよりも、かなり大きいものである。加熱の効果を確かめるため、他の技術である還流もまた、利用された。以下の表は、加熱された超音波振動槽における、種々の抽出サイクル後の試料 100 mg あたりの D - ピニトール / 内部標準の面積比の概要を示している。

30

【0139】

【表 12】

表 12

	1回還流	2回還流	3回還流	4回還流	1回1時間還流
1	0,708	0,711	0,674	0,718	0,722
1b	0,717	—	—	—	—
2	0,709	0,698	0,722	0,660	0,710
平均	0,711	0,705	0,698	0,689	0,716

40

【0140】

表 12 および図 13 に示されるように、還流によって得られた面積比は、1、2、3 および 4 サイクルの還流後のもの、および、一度だけ 1 時間還流した場合のものともまた、同様であった。これらの値の範囲に近づくためには、少なくとも 2 回は超音波振動槽にお

50

いて振動を加えることが必要であろう。還流によって得られた値もまた、わずかに高くなっている。これが偶然かどうかは、これら2つの実験からは決定することができない。それでも、図14に示されるように、還流が最も生産的であり、最も労力を要さない抽出方法であることが明らかである。

#### 【0141】

最後の方法の開発において、第1に、内部標準溶液が着目され、10.5mgのキシリトールが、天秤上のメスフラスコに量り取られ、メタノール中に溶解された。これは、100mlに希釈された。この溶液のうち、15mlは、250mlのメスフラスコに移され、250mlに希釈された。内部標準の分量は、試料=1における、D-ピニトール/キシリトールの比率を与える。

10

#### 【0142】

次いで、試料の調製のため、100mgの浸出液が丸底フラスコに量り取られた。次いで、50mlの内部標準溶液が添加された。混合物は、30分間還流された。冷却後、チューブに移され、3000gで5分間遠心された。上澄みが受取容器に移された。次いで、これの150μlが反応バイアルに移され、窒素蒸気下で乾燥された。次いで、50μlの誘導体化試薬(BSTFA 1%TMCs-ピリジン 2:1)が添加され、ボルテックスされた。反応バイアルは、70℃の加熱ブロックで1時間加熱された。バイアルを冷却した後、内容物は、GC自動注入器と互換性のあるバイアルに移された。

#### 【0143】

以下の温度勾配が分析に使用された。最初の2分間は、温度は65℃であり、次いで、温度は、6℃/分の速度で300℃まで上げられた。次いで、300℃で15分間保持された。1.3ml/分の流速のガスが使用された。

20

#### 【0144】

方法のバリデーションについて、分析方法のバリデーションは、ICHガイドラインに即して行われた。これらガイドラインによれば、アッセイの、線形性、再現性かつ室内再現精度、的確性、特異性および範囲が評価される。

#### 【0145】

校正のモデルおよび範囲の決定において、線形性は、試料中のアナライトの濃度と同等である結果が得られるということで定義する。校正範囲はアナライトの最小濃度と最大濃度との間の間隔であり、この範囲において分析方法が的確であり、正確であり、かつ線形であることを示している。

30

#### 【0146】

応答作用は、40~200%の理論値を示す5つの内部標準を2回インジェクションすることにより測定された。校正のモデルが線形であるか決定するために、校正曲線が、視覚的に検査され、線形回帰分析が行われる。図15は、反応曲線が線形を示し、直線であることを示している。

#### 【0147】

【表 13】

表 13

傾きについての t 検定	
理論値	2,2281392
計算値	119,3243

95%信頼区間 交点(0,0)	
最低 95%	最高 95%
0,000770923	0,048859935

10

## 【0148】

表 13 は、傾きについての t 検定を行った回帰分析の妥当性および、交点 (0, 0) における 95% の信頼区間を示している。回帰分析の結果から、相関関数は、0.999298、言い換えると 0.99 よりも大きく、充分であることが明らかである。表 13 から明らかなように、図 15 にも同様に見られるような、右側に有意な傾きが認められる。交点における 95% の信頼区間が計算される場合、直線は、(0, 0) を通過しないことが明らかである。

20

## 【0149】

誤差である  $y_i - \hat{y}_i$  は、誤差がランダムに分布しているかどうか、言い換えると等分散性を示しているかどうかを決定するために、 $x_i$  または  $\hat{y}_i$  に対してプロットされる。図 16 は、誤差が規則的に分散しており、等分散のモデルであることを示している。有意な偏差を示す誤差は、依然として期待値と比べて 5% 未満の偏差を有している。

## 【0150】

モデルが正しいかどうかを決定するために、分散分析欠如テスト (Analysis of Variance Lack of Fit Test) が実施された。2つの測定値 (それぞれの濃度に対してのもの) の平均が、該二つの測定値の分散の観点から、校正曲線から著しく逸脱する場合、F 値は臨界値に比べて大きくなるであろうし、そのようなモデルは誤って選択されたものである。算出された F 値は 0.7 であり、4.534 よりも小さい。これらすべてのデータは、校正モデルが線形であることを示している。

30

## 【0151】

同じ試料について所定の方法で分析が行われる場合、その方法は、正確性または再現性の観点から、常に同じ結果を提供すると予測される。このため、方法の正確性または再現性は、異なるレベルで検証される。インジェクションの再現性は、同じ試料を 6 回インジェクションすることにより決定される。別々の 3 つの日において、一日における再現性およびその途中の中間精度を確認するため、6 つの試料が分析された。

40

## 【0152】

異なる濃度レベル、すなわち範囲内の最小濃度および最大濃度、たとえば理論値の 50% および 200% においてもまた、正確性が分析された。

## 【0153】

インジェクションの再現性を分析するために、測定結果である平均、標準偏差および相対標準偏差から、以下のパラメータが算出された。

## 【0154】

以下の表 14 は、同じ試料を 6 回インジェクションした D - ピニトールの、平均、標準偏差、相対標準偏差を % 表記で示している。この表から、標準偏差および相対標準偏差が

50

非常に小さいこと、すなわちインジェクションに再現性があることが分かる。

【 0 1 5 5 】

【 表 1 4 】

表 14

D-ピニトールの割合 (%)	
1	0.6329
2	0.6308
3	0.6279
4	0.6297
5	0.6328
6	0.6302
平均	0.6307
s	0.0019
RSD	0.3025

10

【 0 1 5 6 】

20

【 表 1 5 】

表 15

	ピニトールの割合 (%)		
	1日目	2日目	3日目
1	0.6316	0.6252	0.6360
2	0.6187	0.6307	0.6292
3	0.6313	0.6292	0.6412
4	0.6257	0.6267	0.6378
5	0.6319	0.6274	0.6386
6	0.6257	0.6237	0.6441
平均	0.6275	0.6271	0.6378
s	0.0052	0.0026	0.0051
RSD%	0.8264	0.4103	0.7970
全平均	0.6308		
s合計	0.0066		
RSD%合計	1.0442		

30

40

【 0 1 5 7 】

再現性および中間精度の点から、インジェクションの正確さと同様の計算に加え、95%信頼区間、日中および日差変動が算出された。この目的において、分散の単一因子分析 (unifactorial analysis)、すなわち分散分析単一因子テスト (ANOVA single factor test) が実施された。この目的のためには、まず、それぞれのグループの偏差がお互いから大きく異ならないかどうかを確認することが必要であった。さもなければ、ANOVAテストは使用できない。

【 0 1 5 8 】

以下の表 15 は、種々の日における D - ピニトールの含有量について、平均値、標準偏差および相対標準偏差とともに、その概要を % 表記で示すものである。

50

【 0 1 5 9 】

この表によれば、標準偏差が小さいこと、および、2日目の標準偏差はほかの日と比べておよそ半分程度と小さいことが明らかである。偏差の係数もまた、比較的小さい。異なる日において結果の間に差があるかどうかを決定するために、分散分析テストが行われた。この試験を行う前に、偏差が等しいかどうか決定する必要がある。このために、コクランの検定が利用され、以下の式(1)が与えられる。

【 0 1 6 0 】

【 数 1 】

$$C = \frac{S_{max}^2}{\sum_j S_j^2} \quad (1)$$

10

【 0 1 6 1 】

以下の表16は、種々の日の偏差および、コクランの計算値および臨界値の概要を示している。

【 0 1 6 2 】

【 表 1 6 】

表 16

20

	偏差
1日目	0,00002689
2日目	0,00000662
3日目	0,00002584
コクランの臨界値	0,707
コクランの計算値	0,4530

30

【 0 1 6 3 】

この表は、コクランの計算値が臨界値よりも小さいことを示している。言い換えると、偏差は同じであると考えられ、分散分析テストが実施され得ることを示している。

【 0 1 6 4 】

以下の表17は、偏差の分析の概要(平方和、自由度、平均平方およびF値)を示している。

【 0 1 6 5 】

40



【表 17】

表 17

変動要因	平方和	自由度	平均平方
グループ間	0,000440842	2	0,000220421
グループ内	0,000296754	15	1,97836E-05
合計	0,000737595	17	
<i>F</i>	<i>P</i> 値	<i>F</i> テストの臨界値	
11,14161558	0,001082263	3,682316674	

10

F 値の計算値は、F 値の臨界値よりも高い。このことから、異なる日では結果が異なることが結論付けられ得る。偏差がまだ許容できるかどうかを決定するために、単一試験室で確立され得る最大 R S D % の概算を与える R S D %<sub>between</sub> が、 $2 / 3$  R S D %<sub>Horwitz</sub> と比較される。次いで、濃度のみを考慮する式 ( 2 ) が以下に示される。

【0166】

20

$$R S D \%_{H o r w i t z} = 2 ( 1 - 0 , 5 \log C ) \quad ( 2 )$$

ここで C は濃度 ( m / m ) である。

【0167】

以下の表 18 は、標準偏差、% 表記された相対標準偏差、R S D<sub>Horwitz</sub> および最大相対標準偏差を示している。

【0168】

【表 18】

表 18

s within	0,00445
RSD within	0,70510
s between	0,01367
RSD between	2,16770
RSD Horwitz	4,28724
RSD max	2,85816

30

40

【0169】

この表は、R S D %<sub>between</sub> が R S D<sub>max</sub> よりも小さく、このことから、この方法が、分散分析テストに対して相違が見られるという事実にもかかわらず、依然として正確であると結論付け得ることを示している。単一の日の結果についての R S D % は非常に小さく、分散分析テストにおいて有意な相違が見られる確率が増加している。図 17 は、種々の日ごとの単一測定値および平均値のグラフであり、測定値の重複を示している。

【0170】

【表 19】

表 19

	ピニトールの割合 (%)				
	50%	100%	100%	100%	200%
1	0.6374	0.6316	0.6252	0.6360	0.6322
2	0.6386	0.6187	0.6307	0.6292	0.6416
3	0.6391	0.6313	0.6292	0.6412	0.6370
4	0.6462	0.6257	0.6267	0.6378	0.6349
5	0.6370	0.6319	0.6274	0.6386	0.6452
6	0.6526	0.6257	0.6237	0.6441	0.6337
平均	0.6418	0.6275	0.6271	0.6378	0.6374
s	0.0063	0.0052	0.0026	0.0051	0.0050
RSD%	0.9739	0.8264	0.4103	0.7970	0.7867
全平均	0.6343				
s合計	0.0076				
RSD%合計	1.1981				

10

【0171】

20

【表 20】

表 20

	偏差
50%	0,00003907
100%	0,00002689
100%	0,00000662
100%	0,00002584
200%	0,00002514
コクランの臨界値	0,5060
コクランの計算値	0,3162

30

【0172】

種々の濃度レベルにおける中間精度は、以下のとおりに、試験される。上記表 19 には、50 mg 試料、100 mg 試料および 200 mg 試料における D - ピニトールの含有量が、それぞれのシリーズ毎に、平均値、標準偏差および相対標準偏差とともに示されている。このように、この表 19 は、種々の日における、D - ピニトールの含有量の概要を、平均値、標準偏差および % 表記された相対標準偏差と共に示している。

40

【0173】

この表から明らかとなお、平均値に対する標準偏差の誤差はすべて、どこでも、絶対値と同じ順である。種々の濃度レベルの測定の間には有意な違いがあるかどうかを決定するため、ここでもまた、偏差が有意に異なることを確認した後に、分散分析テストを実施した。

【0174】

50

上記表 20 は、異なる日の偏差の概要およびコクランの計算値および臨界値を示している。

【0175】

ここでもまた、コクランの計算値は、臨界値よりも小さく、このことから、種々のグループの偏差の間に有意な差は見られないと結論付け得ることがわかった。

【0176】

以下の表 21 は、偏差の分析の概要（平方和、自由度、平均平方および F 値）を示している。

【0177】

【表 21】

10

表 21

変動要因	平方和	自由度	平均平方
グループ間	0,001057149	4	0,000264287
グループ内	0,000617836	25	2,47134E-05
合計	0,001674985	222	

F	P値	Fテストの臨界値
10,69407953	3,42484E-05	2,758710593

20

【0178】

上記表 21 の分散分析テストによれば、F 値の計算値は、F 値の臨界値よりも大きく、したがって、異なるグループ間で有意な差があるということがわかる。50%の結果と200%の結果とは、100%のすべての結果と重複しないことが如実にわかった。それでも、%表記された相対標準偏差、変動係数が、実験室で見られる最大偏差、 $RS D_{max}$ よりも小さいため、グループ間の偏差は依然としてこの方法に対して許容できるものである。

30

【0179】

以下の表 22 は、標準偏差、%表記された相対標準偏差、 $RS D_{Horwitz}$ および最大相対標準偏差を示している。

【0180】

## 【表 2 2】

表 22

s within	0,0050
RSD within	0,7837
s between	0,0080
RSD between	1,2675
RSD Horwitz	2,1418
RSD max	1,4279

10

## 【0 1 8 1】

図 1 6 によれば、濃度レベルの点で傾向が見られないことが結論付けられ得るであろう。これにより、十分な溶媒が使用され、溶解性において問題がないことも、結論付けられ得るであろう。さもないと、試料の m g 数が減るにつれて、それらの値は増加するであろう。

## 【0 1 8 2】

20

正確さに関する限り、測定された値が正しい値であるかどうかを見極めるために、3つの型の試験構成（テストミクスチャー法、標準添加法、および、一般に許容された方法での比較）をとることが可能である。ここでは、植物原料から再構成物を作製することができず、すべての構成成分が知られている訳ではないため以前として許容し得る利用可能な方法がなく、開発される必要があるという理由から、標準添加法だけが適用可能である。標準添加法は、試料の単一量が、既知の分量の標準溶液に添加されることを意味する。次いで、以下の式を用いて、どれだけの物質が回収されるかが決定される。

## 【0 1 8 3】

## 【数 2】

30

$$\text{回収(\%)} = \frac{X_{\text{after}} - X_{\text{before}}}{X_{\text{added}}} \times 100$$

## 【0 1 8 4】

以下の表 2 3 は、回収値を、平均値、標準偏差、相対標準偏差および 9 5 % 信頼区間とともに示している。

## 【0 1 8 5】

【表 2 3】

表 23

	添加(%)	回収(%)
1	50	99.05483058
1	50	101.5438868
2	100	107.2875403
2	100	105.8382079
2	100	105.5938629
3	125	106.5970772
3	125	105.8311879
3	125	106.0000916
平均		104.72
s		2.858
RSD		2.729
信頼区間		[102.34 - 107.12]

10

20

【0 1 8 6】

【表 2 4】

表 24

	添加(%)	回収(%)
1	50	101.61
1	50	103.65
1	50	103.77
2	100	103.95
2	100	105.69
2	100	107.18
3	125	104.73
3	125	105.26
3	125	105.64
平均		104.61
s		1.594
RSD		1.524
信頼区間		[103.38 - 105.84]

30

40

【0 1 8 7】

対応する図 1 9 は、標準添加法にしたがって回収した値のグラフであり、1 は 5 0 % 添加を示し、2 は 1 0 0 % 添加を示し、3 は 1 2 5 % 添加を示している。

【0 1 8 8】

以下の表 2 4 は、回収値を、平均、標準偏差、相対標準偏差および 9 5 % 信頼区間とともに示している。

【0 1 8 9】

対応する図 2 0 から同様に明らかなように、該表 2 4 は、標準添加法を用いて見つけた値を示している。ここに、1 は 5 0 % 添加を示し、2 は 1 0 0 % 添加を示し、3 は 1 2

50

5 % 添加を示しており、50 % が添加された値は100 % または125 % が添加された際の値よりも、いくらか低い。これが単なる変動であるかどうか決定するためには、再度、実験を行われなければならない。一般に、100 % をいくらか超えて回収されたとは、分析が実施されたと考えるべきである。回収実験は、マトリックスが添加の前後で同じであるため、絶対的でない相対的なシステム上のエラーのみを示すということにも留意すべきである。

#### 【0190】

特異性決定のため、他の物質は測定されずアナライトのみが測定されたものであるかどうかを決定すべく、質量分析検出法を用いて、この分析が繰り返された。また、この分析は、他の物質が同時には溶出されなかったものであるかどうか決定すべく、内部標準を用いずに実施された。図21は、内部標準なしの場合の、この分析の部分クロマトグラムを表す。20 ~ 21分において、干渉は見られなかった。

10

#### 【0191】

図22は、内部標準ありの場合の、この分析の部分クロマトグラムである。クロマトグラム中のキシリトールの位置に、干渉は見られなかった。

#### 【0192】

質量分光分析もまた、特異的な方法であると認定されている。対応する質量分析スペクトルが、図23以降に示されており、図23は、内部標準なしの場合の、この分析の全クロマトグラムであり、分ごとの電圧(mV)で示されている。

20

#### 【0193】

図24は、内部標準物質についてのこの分析の全クロマトグラムを分ごとの電圧(mV)で示したものであり、 $R_t = 20$ 分におけるピークはキシリトールであり、 $R_t = 22.45$ のピークは、D - ピニトールである。

#### 【0194】

図25から28は、それぞれ、標準物質であるキシリトール、試料中のキシリトール、D - ピニトール試料および標準物質であるD - ピニトールについての質量スペクトルの特異性を示すものであり、最も高い信号の関数として、百分率の相対的な存在量を示している。

#### 【0195】

デスマディウム・アドセンデンス浸出液の肝臓保護効果についてのインビボ評価に関する限り、D - ピニトールは、肝臓保護効果を有する。デスマディウム・アドセンデンスの浸出液の構成成分の1つが、D - ピニトールである。デスマディウム・アドセンデンス浸出液の肝臓保護効果についてのインビボ評価に関し、これまでの分析から、該植物浸出液が元来約0.65 % のD - ピニトールを、代表的なものとしてではないものの、含んでいるように思われる。このインビボ実験において、ガラクトサミンによって誘発される肝臓損傷に対するデスマディウム・アドセンデンスの浸出液の予防効果が、ラットにおいて調査された。参照用の試薬として、シリマリンが使用された。シリマリンは、ミルク・シスル(milk thistle)植物であるシリバム・マリアナム(Silybum marianum)の果実に由来する種々のフラボノリグナンの混合物である。主成分は、シリピン、シリクリスチンおよびシリジアニンである。加えて、少量のイソシリピンが、ミルク・シスルには存在する。

30

40

#### 【0196】

したがって、試験動物において、投与量と治療スケジュールとの最適化の目標および、エタノールおよびアセトアミノフェンによる肝臓損傷に対する推定される影響の探索を行う多くのインビボ試験が実施された。

#### 【0197】

実施された実験では、試験動物の6つのグループに対して、以下の計画が利用された。

デスマディウムの浸出液 20 mg / kg、  
デスマディウムの浸出液 5 mg / kg、  
D - ピニトール 20 mg / kg、

50

シリマリン 20 mg / kg ( ポジティブコントロール )、  
 処理なし 650 mg / kg の1回投与を伴うガラクトサミン中毒症 ( ネガティブコントロール )  
 処理なし 中毒症なし

#### 【0198】

治療スケジュールは、以下のとおりである。

0日目：デスマディウムの浸出液による処理：20 mg / kg または 5 mg / kg

D - ピニトールによる前処理：20 mg / kg

シリマリンによる前処理：20 mg / kg

1日目：デスマディウムの浸出液による前処理：20 mg / kg または 5 mg / kg 10

D - ピニトールによる前処理：20 mg / kg

シリマリンによる前処理：20 mg / kg

ガラクトサミンの投与に直ちに続いて

2日目：すべての血液グループ ( 24 時間 )

デスマディウムの浸出液による処理：20 mg / kg または 5 mg / kg

D - ピニトールによる処理：20 mg / kg

シリマリンによる処理：20 mg / kg

3日目：すべての血液グループ ( 48 時間 )

#### 【0199】

それぞれの実験には、以下の3つのコントロール群を存在させた。 20

シリマリン 20 mg / kg ( ポジティブコントロール )

処理なし 650 mg / kg のガラクトサミンのみの中毒症 ( ネガティブコントロール )

処理なし 中毒症なし

#### 【0200】

実施された実験では、24時間経過後の効果は、あまり明確とは思われなかったが、48時間経過後の効果は明確であった。そのため、追跡実験では、24時間時点において血液試料は採取されず、少なくとも追加の24時間経過後の第2試料により48時間後のみ、あるいは、場合によってはいっそう遅い時間における第3血液試料が採取された。

#### 【0201】

投与量および治療スケジュールの最適化は、D - ピニトールを用いた実験において行われた。次いで、この投与量は、他の実験のために、デスマディウムの浸出液に基づいて算出された。試験された製剤の肝臓保護効果を決定するために、選択された実験動物、すなわちSD系ラットは、肝毒性試薬が投与される前に、0日および1日目に前処理が行われた ( 1日目 )。2日目には、1回の後処理もまた行われた。デスマディウムの浸出液、純粋な有効成分であるD - ピニトールおよびポジティブコントロールであるシリマリンは、すべて、胃管栄養法により経口投与された。 30

#### 【0202】

このことが上記6つの試験グループに帰結した。6つの試験グループとは、すなわち：  
 コントロール：肝毒性試薬なし ( 賦形剤 )、処理なし ( 賦形剤 ) 40

肝毒性：肝毒性効果あり、処理なし ( 賦形剤 )

デスマディウム1：肝毒性効果あり、20 mg / kg のD - ピニトールと等価であるデスマディウムによる処理あり

デスマディウム2：肝毒性効果あり、5 mg / kg のD - ピニトールと等価であるデスマディウムによる処理あり

D - ピニトール：肝毒性効果あり、20 mg / kg の純粋なD - ピニトールによる処理あり

シリマリン：肝毒性効果あり、20 mg / kg のシリマリンによる処理あり  
 である。

#### 【0203】

要約すると、治療スケジュールは、以下のとおりである。0日目および1日目において、1つの試験製剤に対して前処理が行われた。前処理の後、実験動物のグループには、1日目の肝毒性物質である、D - ガラクトサミン 650 mg / kg IP 2 % のフィジオール溶液が与えられた。2日目において、同様の治療量が投与された。2日目および3日目において、尾静脈から 1.5 ml の血液が採取された。血清における次のパラメータ、すなわち ALT ( = GPT )、AST ( = GOT )、ALP が決定されることにより、肝臓損傷および生じ得る肝臓保護作用が評価された。試験の結果は以下のとおりであった。それぞれの表および図 29 以降を参照。肝毒性試薬である D - ガラクトサミンを投与した後、24 時間経過後および 48 時間経過後のいずれにおいても、決定された 3 つのパラメータが顕著に増加したことにより ( コントロール VS 肝毒性 )、肝臓損傷が観察された。

10

#### 【 0 2 0 4 】

24 時間経過後、肝毒性グループとの比較では、いずれの処理群にも AST ( GOT ) および ALP の有意な減少は見られなかった。ポジティブコントロールであるシリマリンについても同様であった。ALT ( GPT ) については、デスマディウムグループおよびシリマリンのいずれにおいても有意な減少が見られた。

#### 【 0 2 0 5 】

48 時間経過後、結果はより明確であった。肝毒性グループとの比較で、AST ( GOT ) および ALT ( GPT ) のいずれもが、すべての処理群、すなわちデスマディウム投与群、D - ピニトール群およびシリマリン群のいずれにおいても有意に減少した。いくつかの顕著な結果としては、デスマディウムの最小投与量 ( 5 mg / kg の D - ピニトールと等価 ) が、すでにその最大投与量 ( 20 mg / kg の D - ピニトール ) に匹敵する非常に顕著な効果を示したこと、デスマディウムのこれらの投与量はいずれも、シリマリンより有効かあるいは少なくとも同等であったこと、および、デスマディウムのこれらの投与量は 20 mg / kg の純粋な D - ピニトールよりも有効かあるいは少なくとも同等であったことがある。パラメータである ALP に関する限り、処理が行われた後も何ら効果は見られなかった。おそらくより長期の処理が必要と考えられる。

20

#### 【 0 2 0 6 】

したがって、基準化されたデスマディウム・アドセンデンス製剤の肝臓保護作用は、行われた治療スケジュールにおいて明確に証明されたと結論付けられ得る。デスマディウムの浸出液の最小投与量において得られた良好な結果の観点から、効果の投与量依存性に関するさらなる研究が必要とされた。より長期の前処理、肝毒性試薬の投与後からのみ始まる治療処理の効果、および、これら 2 つの混合は、おそらくより広範な一連の肝臓損傷のパラメータに関して、さらに調査され得る。

30

#### 【 0 2 0 7 】

その他の実験は、先の実験と同様にデスマディウムの浸出液の同じ投与量とともに、ガラクトサミンに代わる、エタノール誘発性肝臓損傷の実験の設計および遂行から構成されている。

#### 【 0 2 0 8 】

ラットにおける化学的に誘発された肝臓損傷に対する基準化されたデスマディウム・アドセンデンスの抽出物および D - ピニトールの抗肝毒性作用、特にエタノール誘発性の肝臓損傷に対する D・アドセンデンスの浸出液の保護効果が、調査された。

40

#### 【 0 2 0 9 】

実験の目的は、主要な成分である D - ピニトールに基準化され、エタノール誘発性の肝臓損傷に対するデスマディウム・アドセンデンスの浸出液の肝臓保護効果を評価することである。

原料および方法：200 ~ 225 g の 66 匹のオスのウィスターラット ( チャールズ川、ブリュッセル、ベルギー ) が、ランダムに 6 つのグループに分けられた：ネガティブコントロールグループ ( CON：肝毒性試薬なし、処理なし：8 匹のラット )、肝毒性グループ ( HEP：肝毒性の誘導、処理なし：20 匹のラット )、デスマディウム 1 グループ (

50



肝毒性の誘導、デスモディウム・アドセンデンスの浸出液による処理、2 mg / kg の D - ピニトールと等価：10 匹のラット)、デスモディウム 2 グループ (肝毒性の誘導、デスモディウム・アドセンデンスの浸出液による処理、10 mg / kg の D - ピニトールと等価：10 匹のラット)、D - ピニトールグループ (PIN：肝毒性の誘導、10 mg / kg の D - ピニトールと等価：10 匹のラット)、ポジティブコントロールグループ (SIL：肝毒性の誘導、20 mg / kg のシリマリンによる処理：8 匹のラット)。エタノールの投与の 2 日前、適当量の凍結乾燥された浸出液、ピニトール、シリマリンまたは水中懸濁が (あるいは、コントロールグループに対しては賦形剤が)、胃管栄養法により投与された。55 %エタノール溶液 (ネガティブコントロールグループを除く) による毎日の経口胃管栄養法によって、肝毒性が誘発された。初期投与量である 2 g / kg のエタノールは、実験の最初の 1 週間の間に、段階的に 6 g / kg の投与量に増加された。エタノールは、7 週間の間、投与された。投与は毎日行われ、実験の最後まで、グループ毎に、特定の浸出液であるピニトールまたはシリマリン (経口胃管栄養) で処理された。エタノールの投与群 (デフォルト値) に対し、3 週目、4 週目、5 週目および 6 週目に、血液試料 (1.5 ml) が尾動脈の側部から採取された (Multi Fat 600、Sarstedt)。この実験は、アントワープ大学動物実験倫理委員会の公認であった (17 - 01 - 2011、2010 - 37)。

10

【0210】

【表25】

20

表 25

CON:エタノールなし、処理なし

HEP:エタノールあり、処理なし

DES1:エタノールあり、2mg/kgのD-ピニトールと等価のデスモディウム・アドセンデンスによる処理あり

DES2:エタノールあり、10mg/kgのD-ピニトールと等価のデスモディウム・アドセンデンスによる処理あり

PIN:エタノールあり、D-ピニトール処理(10mg/kg)あり

SIL:エタノールあり、シリマリン処理(20mg/kg)あり

30

【0211】

異なる処理がされたグループの模式的な概要が以下に示される。試験動物の血清試料中のアスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST、GOT) の濃度およびアラントランスアミナーゼ (ALT、GPT) の濃度は、通例の検査手段 (シニア、2009 年) によって定量された。濃度の上昇は、肝細胞破壊または膜透過性の指標と考えられる。

【0212】

AST および ALT についての CON と HEP との間の相違、および、AST および ALT についての HEP と DES1、DES2、PIN および SIL との間の相違を分析する統計は、混合モデル解析により実施した。生存データの統計的分析のため、対数順位検定が行われた。

40

【0213】

結果：実験の 4 週目、5 週目および 6 週目における血清の AST 値および ALT 値が、表 26 ~ 31 および図 32 ~ 34 および 36 ~ 38 に示される。異なる時点 (0 週目、2 ~ 6 週目) における平均 AST 値および平均 ALT 値が、図 35 および 39 に示される。表 32 および 33 および図 40 は、それぞれの動物グループにおける生存時間を示している。

【0214】

50

## 【表 2 6】

表 26

	血清AST		AST_4
	平均		SEM
	(U/l)	(U/l)	(U/l)
CON	63,6	6,7	2,4
DES1	79,8	12,3	5,5
DES2	77,3	9,9	3,7
PIN	89,3	9,3	3,8
SIL	83,2	21,7	9,7
HEP	84,2	16,3	5,1

↓  
標準偏差

10

20

## 【 0 2 1 5 】

## 【表 2 7】

表 27

	AST_5	
	平均	SEM
	(U / l)	(U/l)
CON	65.3	7.4
DES1	75.4	8.6
DES2	75.5	11.5
PIN	78.3	15.8
SIL	72.1	8.6
HEP	83.8	8.7

↓  
標準偏差

30

40

## 【 0 2 1 6 】

上記表 2 6 は、エタノール投与から 4 週間後の血清の A S T 値を示している。図 3 2 は、エタノール投与から 4 週間後の血清の A S T 値を示している。 $^*p < 0.05$ 、 $^{**}p < 0.01$ 、 $^{***}p < 0.001$  対 H E P、C O N； $^+p < 0.05$  対 H E P、D E S 1、D E S 2、P I N、S I L（混合モデル分析）。

## 【 0 2 1 7 】

上記表 2 7 は、エタノール投与から 5 週間後の血清の A S T 値を示している。

## 【 0 2 1 8 】

図 3 3 は、エタノール投与から 5 週間後の血清の A S T 値を示している。 $^*p < 0.0$

50

5、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$  対 HEP、CON；+  $p < 0.05$  対 HEP、DES1、DES2、PIN、SIL（混合模型分析）。

【0219】

以下の表28は、エタノール投与から6週間後の血清のAST値を示している。

【0220】

【表28】

表 28

	AST_6		
	平均 (U/l)	標準偏差 (U/l)	SEM (U/l)
CON	53.1	6.8	3.0
DES1	75.9	15.3	6.3
DES2	75.9	13.2	5.4
PIN	86.3	9.4	4.7
SIL	77.8	,3	,2
HEP	75.0	4.1	2.0

10

20

【0221】

【表29】

表 29

	血清ALT	ALT_4	
	平均	標準偏差	SEM
CON	43.6	9.1	3.0
DES1	71.0	29.1	11.9
DES2	58.8	14.0	5.3
PIN	75.9	15.5	6.3
SIL	57.4	9.9	4.4
HEP	63.2	19.0	5.7

30

【0222】

図34は、エタノール投与から6週間後の血清のAST値を示している。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$  対 HEP、CON；+  $p < 0.05$  対 HEP、DES1、DES2、PIN、SIL（混合模型分析）。

40

【0223】

図35は、時間ごとの平均AST値を示している（0、2、3、4、5および6週目）。

【0224】

上記表29は、エタノール投与から4週間後の血清のALT値を示している。

【0225】

【表 3 0】

表 30

## ALT\_5

	平均	標準偏差	平均標準誤差
CON	39.8	7.6	2.5
DES1	52.3	10.7	4.4
DES2	52.8	17.5	6.6
PIN	61.6	19.2	8.6
SIL	44.8	6.9	4.0
HEP	52.0	13.4	4.2

10

【 0 2 2 6】

【表 3 1】

表 31

## ALT\_6

	平均	標準偏差	平均標準誤差
CON	37.0	9.1	4.1
DES1	56.6	7.7	3.1
DES2	50.1	12.2	5.0
PIN	65.6	15.7	7.8
SIL	59.7	9.3	6.6
HEP	47.9	5.3	2.6

20

30

【 0 2 2 7】

上記表 3 0 は、エタノール投与から 5 週間後の血清の A L T 値を示している。

【 0 2 2 8】

図 3 6 は、エタノール投与から 4 週間後の血清の A L T 値を示している。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$  対 H E P、C O N；+  $p < 0.05$  対 H E P、D E S 1、D E S 2、P I N、S I L（混合模型分析）。

【 0 2 2 9】

図 3 7 は、エタノール投与から 5 週間後の血清の A L T 値を示している。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$  対 H E P、C O N；+  $p < 0.05$  対 H E P、D E S 1、D E S 2、P I N、S I L（混合模型分析）。

40

【 0 2 3 0】

上記表 3 1 は、エタノール投与から 6 週間後の血清の A L T 値を示している。

【 0 2 3 1】

図 3 8 は、エタノール投与から 6 週間後の血清の A L T 値を示している。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$  対 H E P、C O N；+  $p < 0.05$  対 H E P、D E S 1、D E S 2、P I N、S I L（混合模型分析）。

【 0 2 3 2】

図 3 9 は、時間ごとの平均 A L T 値を示している（0、2、3、4、5 および 6 週目）

50

。

【 0 2 3 3 】

死亡率

表 3 2 は、6 週目を超えた試験グループの試験動物の生存割合を示している。

【 0 2 3 4 】

【 表 3 2 】

表 32

	CON	DES1	DES2	PIN	SIL	HEP
W0	100%	100%	100%	100%	100%	100%
W1	100%	100%	100%	100%	100%	95%
W2	100%	90%	100%	70%	78%	85%
W3	100%	70%	80%	60%	56%	55%
W4	100%	60%	70%	60%	56%	40%
W5	100%	60%	70%	50%	33%	40%
W6	100%	60%	60%	40%	22%	25%

10

【 0 2 3 5 】

20

図 4 0 は、6 週目を超えた試験グループの試験動物の生存割合を示している。表 3 3 は、6 週目を超えた試験グループの試験動物の生存割合の違いを決定するための対数順位検定を示している。

【 0 2 3 6 】

【 表 3 3 】

表 33

比較	P値
CON - HEP	0.0044
HEP-DES1	0.11
HEP-DES2	0.06
HEP-PIN	0.56
HEP-SIL	0.88
全処理グループ	0.141

30

【 0 2 3 7 】

この実験において、エタノール誘導性の肝臓損傷に対するデスモディウム・アドセンデンス浸出液の予防効果が評価された。肝毒性グループ（HEP）では、毎日のエタノール投与を4週間行った後の、血清のAST値およびALT値が顕著な増加を示している。デスモディウム・アドセンデンス（2 mg / kg および 10 mg / kg）、ピニトール（10 mg / kg）またはシリマリン（20 mg / kg）による処理が、エタノール投与の2日前に開始され、6週間後の実験終了まで、さらに毎日投与された。図 3 2 ~ 3 4 および 3 6 ~ 3 8 に示されるように、どの処理に対しても、血清のAST値（それぞれ4、5および6週目の処理後の図 3 2 , 3 3 および 3 4）およびALT値（それぞれ4、5および6週目の処理後の図 3 6 , 3 7 および 3 8）に関して、顕著な減少は観察されなかった。異なる処理グループの動物の死亡率の評価（図 4 0 および表 3 2）は、肝毒性の未処理グループ（HEP）において急降下を示し、一方、生存割合は、DES2において改善された。さらに、6週のエタノール投与後、デスモディウム・アドセンデンス浸出液が投与されたラットの60%が生存し、一方、ピニトール処理グループおよびシリマリン処理グル

40

50

ープにおける生存率は、それぞれ40%および22%であった。生存データ(表33)の統計的分析は、統計的に、コントロールと肝毒性グループ( $p < 0.01$ )との間の有意差を示しており、D・アドセンデンスグループDES2(10mg/kgのD-ピニトールと等価)と処理なし肝毒性グループとの間で、有意差を示す傾向がある。DES1グループ(2mg/kgのピニトールと等価)、ピニトールグループ(10mg/kg)またはシリマリン(20mg/kg)と肝毒性グループとの間には、統計的な有意差は見られなかった。

ラットにおいて、有意なエタノール誘導性の肝毒性作用を発生させるには少なくとも4週間が必要であり、肝毒性の未処理の動物では顕著な減少が見られたため、この実験では、デスモディウム・アドセンデンスの浸出液の肝臓治療効果を調査することは不可能であった。

#### 【0238】

さらなる実験は、ガラクトサミンに代えてアセトアミノフェンによって誘導された肝臓損傷の実験を準備し、行うことから構成される。

この実験は、アセトアミノフェン(パラセタモール)誘導性の肝臓損傷に対し、主成分であるD-ピニトールにより基準化されたデスモディウム・アドセンデンス浸出液の肝臓治療効果を評価することを目的とする。

#### 【0239】

この目的において、原料および方法は、ランダムに5つのグループに分けられた200~225gの40匹のオスのウィスターラットから構成される：ネガティブコントロールグループ(CON：肝毒性試薬なし、処理なし：8匹のラット)、肝毒性グループ(HEP：肝毒性の誘導、処理なし：8匹のラット)、デスモディウム1グループ(肝毒性の誘導、D・アドセンデンスの浸出液による処理、2mg/kgのD-ピニトールと等価：8匹のラット)、デスモディウム2グループ(肝毒性の誘導、D・アドセンデンスの浸出液による処理、10mg/kgのD-ピニトールと等価：8匹のラット)、ポジティブコントロールグループ(SIL：肝毒性の誘導、20mg/kgのシリマリンによる処理：8匹のラット)。急性肝毒性は、2g/kgのアセトアミノフェン(コントロールグループを除く)の経口胃管栄養法によって誘発された。肝毒性の誘導から24時間後、適当量(上記)の凍結乾燥されたD・アドセンデンスまたはシリマリンを水中に懸濁し、経口胃管栄養法によって投与(または、コントロールグループおよび肝毒性グループに対しては賦形剤を投与)することにより、処理が開始された。血液試料は、アセトアミノフェン投与24時間、48時間および72時間後に、切断された尾静脈から採取された(1.5ml、Multi Fat 600、Sarsstedt)。この実験は、アントワープ大学動物実験倫理委員会の公認であった(17-01-2011、2010-37)。

#### 【0240】

それぞれの処理グループについての模式的な概要が以下に示される。

CON：アセトアミノフェンなし、処理なし

HEP：2g/kgのアセトアミノフェン、処理なし

DES1：2g/kgのアセトアミノフェン、2mg/kgのD-ピニトールと等価のD・アドセンデンスによる処理あり

DES2：2g/kgのアセトアミノフェン、10mg/kgのD-ピニトールと等価のデスモディウム・アドセンデンスによる処理あり

SIL：2g/kgのアセトアミノフェン、シリマリン処理(20mg/kg)あり

#### 【0241】

アスパラギン酸アミノ基転移酵素(AST、GOT)およびアラニンアミノ基転移酵素(ALT、GPT)の酵素濃度は、通例の検査手段(シニア、2009年)によって定量された。

#### 【0242】

濃度上昇は、肝細胞破壊または膜透過性の指標とみなすことができる。統計的な目的において、ASTおよびALTについてのCONとHEPとの間の相違、および、ASTお

10

20

30

40

50

よび A L T についての H E P と D E S 1、D E S 2 および S I L との間の相違を分析するために、ダネットのポストホックテスト ( S P S S 統計プログラム ) にしたがって、一方向分散分析が行われた。アセトアミノフェン投与後 4 8 時間および 7 2 時間における血清の A S T 値および A L T 値の結果が、表 3 4 ~ 3 7 および図 2 9 ~ 3 1 に示される。

【 0 2 4 3 】

【 表 3 4 】

表 34

	AST 48		
	平均 (U/I)	標準偏差 (U/I)	SEM (U/I)
CON	62	9	4
DES1	403	363	128
DES2	717	753	266
SIL	1047	1155	408
HEP	704	673	213

10

20

【 0 2 4 4 】

【 表 3 5 】

表 35

	AST 72		
	平均 (U/I)	標準偏差 (U/I)	SEM (U/I)
CON	62	10	3
DES1	76	19	7
DES2	99	38	13
SIL	110	47	17
HEP	81	12	4

30

【 0 2 4 5 】

図 2 9 は、アセトアミノフェン投与後 4 8 時間における血清 A S T 値を示している。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$  対 CON、HEP (統計：一方向分散分析、HEP に対するダネットのポストホック)。

40

血清 A L T

以下の表 3 6 および 3 7 は、アセトアミノフェン投与後 4 8 時間および 7 2 時間における血清 A L T 値を示している。

【 0 2 4 6 】

【表 3 6】

表 36

		alt48		
		平均 (U/I)	標準偏差 (U/I)	SEM (U/I)
	CON	28	6	2
	DES1	208	161	57
	DES2	451	483	171
	SIL	423	380	134
	HEP	327	295	93

10

【 0 2 4 7 】

【表 3 7】

表 37

		alt72		
		平均 (U/I)	標準偏差 (U/I)	SEM (U/I)
	CON	36	16	6
	DES1	49	18	6
	DES2	79	52	18
	SIL	70	42	15
	HEP	59	13	5

20

30

【 0 2 4 8 】

図 3 0 および 3 1 は、アセトアミノフェン投与後 4 8 時間および 7 2 時間における血清 A S T 値を示している。<sup>\*</sup>  $p < 0.05$ 、<sup>\*\*</sup>  $p < 0.01$ 、<sup>\*\*\*</sup>  $p < 0.001$  対 CON、HEP (統計：一方向分散分析、HEP に対するダネットのポストホック)。アセトアミノフェン誘導性の肝臓損傷に対する、デスモディウム・アドセンデンス浸出液の治療効果が評価された。この実験において、肝毒性グループ (HEP) は、アセトアミノフェン投与後 2 4 時間および 4 8 時間における血清 A S T 濃度および血清 A L T 濃度 ( $p < 0.001$ )、アセトアミノフェン投与後 7 2 時間においてもまた A L T 濃度 ( $p < 0.05$ ) の顕著な増加を示した。デスモディウム・アドセンデンス (2 mg / kg および 10 mg / kg) またはシリマリン (20 mg / kg、ポジティブコントロールグループ) の経口処理は、アセトアミノフェンの投与後 2 4 時間および 4 8 時間において行われた。図 2 9 ~ 3 1 に示されるように、いずれの処理においても、4 8 時間および 7 2 時間の血液採取時における血清 A S T 濃度および血清 A L T 濃度に、顕著な減少 ( $p > 0.05$ ) は観察されなかった。アセトアミノフェンによって誘発される、急性の肝臓損傷のラットモデルにおけるこの実験の結果からは、デスモディウム・アドセンデンスは、10 mg / kg までの毎日投与では、肝臓治療効果を有さないことを示している。

40

【 0 2 4 9 】

最後に、いわゆるエイムステストが、U A、すなわちデスモディウム抽出物の試料に対して実施された。抽出物は、O E C D ガイドラインに即して、5 つのサルモネラチフィム

50



リウム (*Salmonella Typhimurium*) 株 (TA98、TA100、TA102、TA1535 および TA1537) とともに、代謝 S9 画分 (a metabolising S9 fraction) の不存在的下および存在の下で試験された。この実験において、新規株、および、S9 および NADPH、ペトリ皿等といった他の必要な原料もまた使用された。

#### 【0250】

ガイドラインに従い、試験は最大試験濃度である 5 mg / プレートから開始され、その後、希釈が行われ、6 用量が使用された。ネガティブ・コントロール (溶媒) には 4 つのペトリ皿が用いられ、ポジティブコントロールには 3 つのペトリ皿が用いられた。ポジティブコントロールは、推奨された試験濃度による推奨されたコントロール一覧の一部である。我々が利用したポジティブコントロールとその濃度一覧が利用可能である。

10

#### 【0251】

こうして、3 つのペトリ皿がそれぞれの濃度で調製され、4 つのペトリ皿がネガティブコントロールとして準備された。その結果として、それらの平均値、とりわけ復帰変異株 (revertants) の平均数  $\pm$  SD を示した。試験は、ネガティブおよびポジティブ濃度が予測範囲内であり、かつ、毒性のサインが見られなければ成功である。これは、バクテリアの背景層を調べることによって決定された。背景層の欠損は毒性を示している。毒性の兆候は見られなかった。また、すべての株およびコントロールが、TA102 に対し、予想された反応を示した。ネガティブ・コントロール (溶媒) との比較で倍増した復帰変異株が見られ、かつ、投与量 - 効果の関係が観察された場合には、被験物質は明らかに「変異原性」である。

20

#### 【0252】

これら結果の総括を以下に示す。上記データは、S9 の存在下および不存在的下の両方において、試料が TA98 株、TA100 株および TA1535 株において変異原性でないことを示している。TA1537 について、ネガティブコントロールと関連して、最大濃度である 5 mg / プレートにおいて S9 存在下で正確な突然変異頻度の倍増が見られたが、明確な投与量 - 効果の関係は見られなかった。念のため、試験は繰り返された。投与量 - 効果の関係は見られず、コントロールに対する倍増も見られなかった。このことは、TA1537 株においては変異原性作用もない、ということを確認している。

30

#### 【0253】

実質的に変異原性作用がないということが実験的に確立され得た。デスモディウム浸出液は、代謝 S9 画分の不存在的下であっても存在下であっても、エイムステストにおいて変異原性ではない。最大投与量における任意の復帰変異株の数の増加が見られたにもかかわらず、「変異原性」との用語を用いるには不十分であった。繰返しの試験 (少なくとも 1 株あたり 1 回) が、変異原性の不存在的を確認している。

#### 【0254】

デスモディウム・アドセンデンスの凍結乾燥品におけるフラボノイド含有量およびプロファイルについて

用いられた方法において、第一に、試料調製が行われる。

標準物質 (参照溶液) を調製するため、10.0 ml のメスフラスコに 5.0 mg のピテキシンが量り取られ、3 ml のメタノール中に溶解され、20.0 ml のメスフラスコに移され、50 % メタノールで希釈された。

40

試料 (試験溶液) を調製するため、25.0 ml のメスフラスコに、それぞれのケースあたり 100 mg の粉体 (凍結乾燥品) が量り取られ、20 ml の 50 % メタノールが添加される。溶液は、次いで、超音波浴で 15 分間、超音波処理される。冷却された後、試料は、50 % メタノールによって 25 ml に希釈される。試験溶液および参照溶液の両方は、ナイロンシリンジフィルターに通される。

HPLC 条件

移動相は、A として 1.0 % (v/v) リン酸水溶液および、B としてアセトニトリルが使用された。グラジエントの条件は、以下のとおりである。

50

開始時の条件：5 %のB

0 ~ 5 分 10 %のB、5 ~ 80 分 50 %のB、85 ~ 90 分 5 %のB

流速は1.0 ml / 分。検出は、360 nmにて。使用されたカラムは、Grace smart columnまたは、Lichrosphere column (250 x 4.5 ミクロン)。

#### 【0255】

結果：標準的なフラボノイドのUVスペクトルを示すすべてのピークが総計された、標準的なD・アドセンデンスにおけるフラボノイドの総含有量は、ピテキシンとして、1.122 %であった。

標準的なHPLCプロファイル

示されたピークは、フラボノイドのUVスペクトル特性を示す。

#### 【0256】

デスマディウム・アドセンデンスの凍結乾燥品

クロマトグラフィ・プロファイルによるフラボノイドへの拡張および含有量

使用された方法

試料調製は上記参照

HPLC条件

移動相は、Aとして0.1 %ギ酸水溶液および、Bとしてアセトニトリルが使用された。グラジエントの条件は、以下のとおりである。

開始条件：15 %のB

0 ~ 5 分 15 %のB、5 ~ 39 分 23 %のB、39 ~ 43 分 100 %のB 43 ~

45 分 100 %のB、45 ~ 47 分 15 %のB、47 分 ~ 55 分 15 %のB

流速は1.0 ml / 分。検出は、334 nmにて。カラムとして、Luna C18 column (Phenomenex) (250 x 4 mm、5 μm) が使用された。

#### 【0257】

結果

フラボノイドプロファイル + 同定

示された方法により、図示されたクロマトグラフィ・プロファイルが得られた。ラベル化された信号 (A ~ F) のダイオードアレイ検出法 (DAD) により、示されたUVスペクトルが導かれた。すべてのラベル化された信号 (ピークA ~ ピークF) は、フラボノイドの特性であるUVスペクトルを示す。

#### 【0258】

当該生成物の単離後、質量分析およびNMR分光分析法により、主要な成分 (ピークE) がピテキシン - 2'' - キシロサイドとして同定された。表は、発表されたデータと比較した<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C - NMRスペクトルのアサインメントを示している。この方法において、ピークFもまた、分光学的に、ピテキシンとして同定することができた。

#### 【0259】

内容物の定量

D・アドセンデンス (の浸出液) の標準的な凍結乾燥品中の、ピテキシンとして表されたフラボノイドの総含有量は、ラベル化された信号の合計として定量され、1.05 %であった。

#### 【0260】

表

ピークE (DMSO - d<sub>6</sub>に溶解) に対する<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C - NMRのアサインメントおよびピテキシン - 2'' - キシロサイド

<sup>13</sup>C (ppm) <sup>1</sup>H (ppm) <sup>13</sup>C (ppm) <sup>1</sup>H (ppm)

2 163.8 164.2

3 102.5 6.70 102.8 6.80 s

4 181.6 182.4

5 160.6 13.10 (OH) 160.9

10

20

30

40

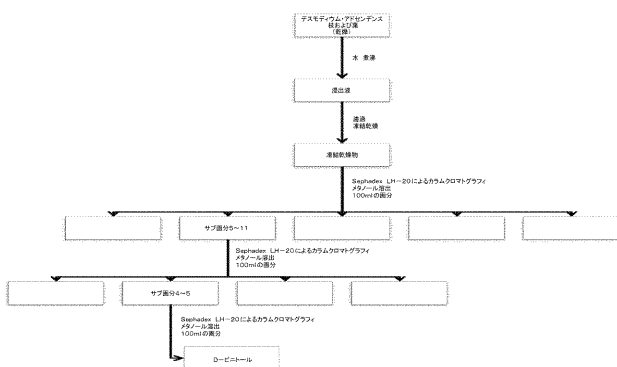
50

6 9 9 . 0 6 . 1 8 9 8 . 5 6 . 2 7 s  
7 1 6 2 . 5 1 6 3 . 1  
8 1 0 4 . 1 1 0 4 . 0  
9 1 5 6 1 5 6 . 9  
1 0 1 0 3 . 3 1 0 4 . 1  
1 ' 1 2 1 . 7 1 2 1 . 9  
2 ' , 6 ' 1 2 8 . 9 7 . 9 9 ( d、8 , 4 H z ) 8 : 0 4 1 2 9 . 2 ( d、8 , 6  
H z )  
3 ' , 5 ' 1 1 6 . 3 6 . 8 9 d , 8 , 4 H z ) 1 1 6 . 3 6 . 9 4 ( d、8 , 6 H  
z )  
4 ' 1 6 1 . 7 1 6 1 . 5  
G l c - 1 7 1 . 9 4 . 7 9 ( d , 7 1 . 9 4 . 8 3 ( d , 9 , 8 H z )  
G l c - 2 8 1 . 7 3 . 2 4 8 2 . 1 3 . 3 2 m  
G l c - 3 7 8 . 8 3 . 4 6 7 8 . 6 3 . 5 8  
G l c - 4 7 0 . 5 3 . 4 2 7 0 . 5 3 . 5 4  
G l c - 5 8 0 . 8 4 . 0 6 8 1 . 6 4 . 0 9 b r t  
G l c - 6 6 1 . 2 3 . 7 3 6 1 . 3 3 . 7 9 3 : 5 4 , 3 . 6 0  
X y l - 1 1 0 6 . 2 3 . 8 8 1 0 6 . 1 3 . 9 1 ( d , 7 , 0 H z )  
X y l - 2 7 3 . 0 2 . 7 5 7 4 . 0 2 . 8 8 d d  
X y l - 3 7 6 . 0 2 . 8 4 7 6 . 2 2 . 9 0 b r t  
X y l - 4 6 9 . 0 3 . 0 7 6 9 . 7 3 . 0 2  
X y l - 5 6 5 . 7 3 . 0 7 , 2 . 3 3 6 5 . 8 3 . 0 2 , 2 : 3 9

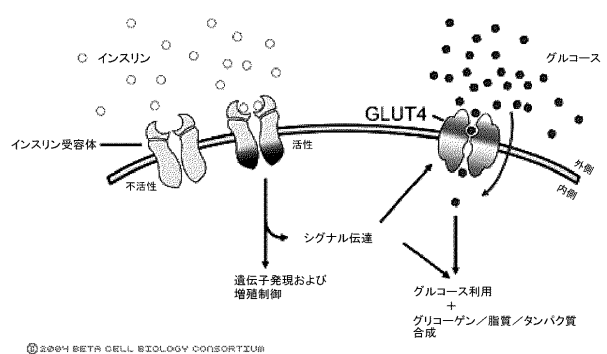
10

20

【 図 1 】



【 図 3 】

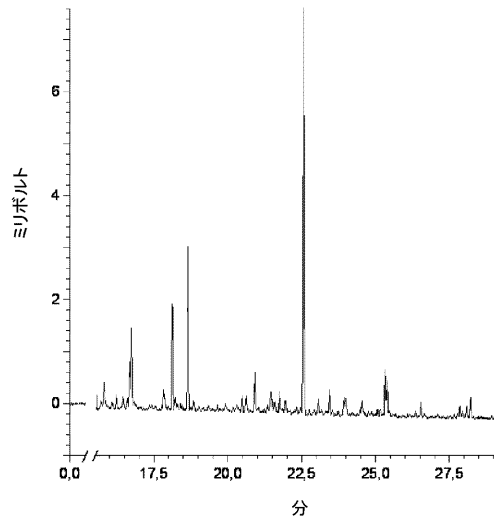


【 図 2 】

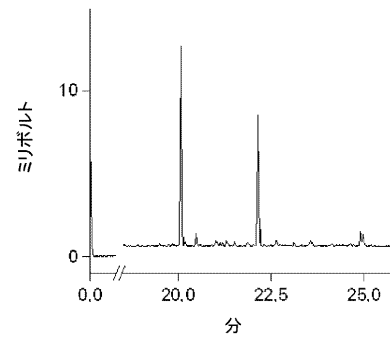


**Fig. 2**

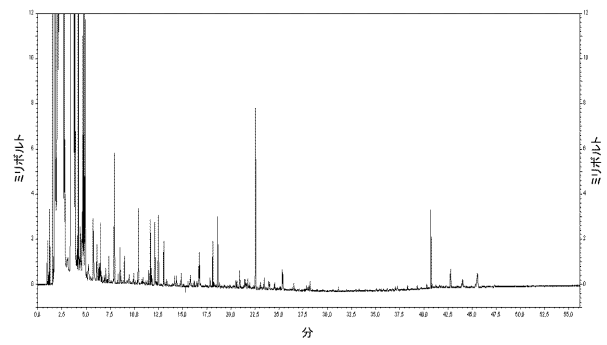
【図 2 1】



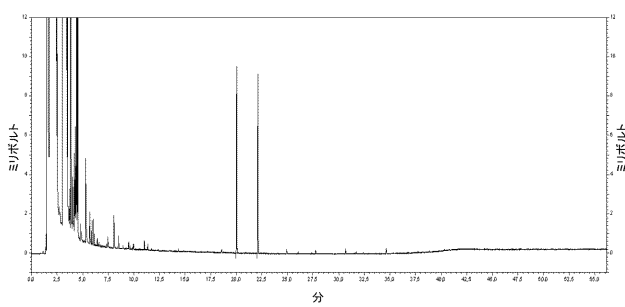
【図 2 2】



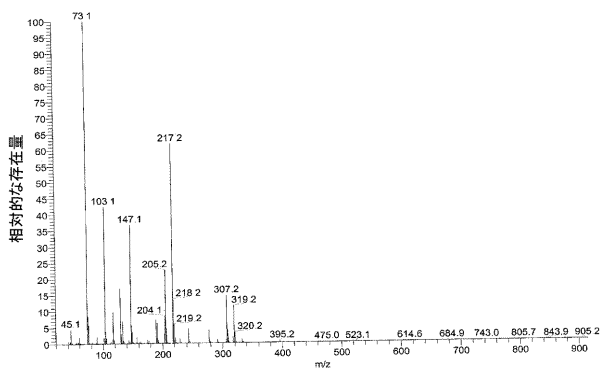
【図 2 3】



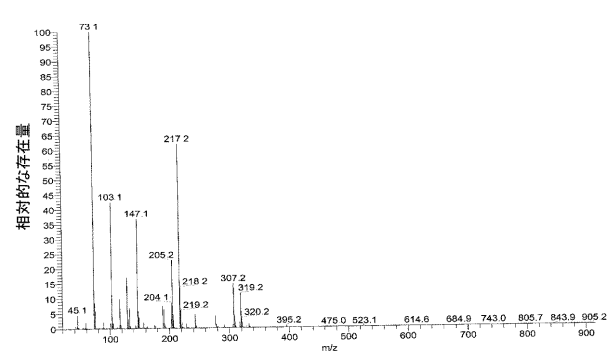
【図 2 4】



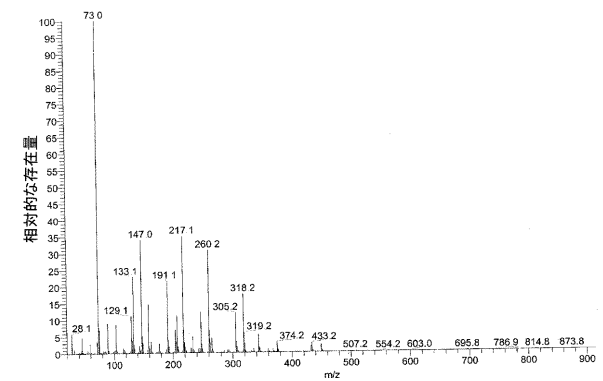
【図 2 5】



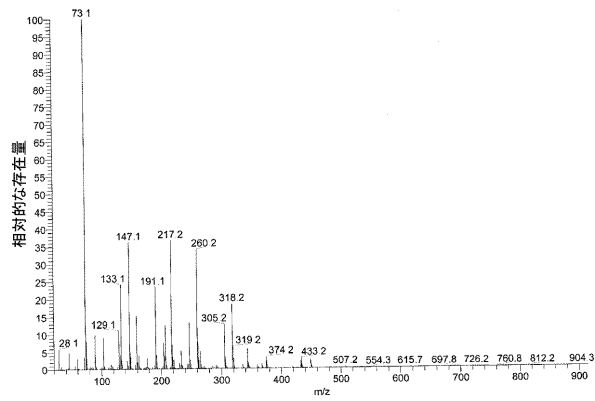
【図 2 6】



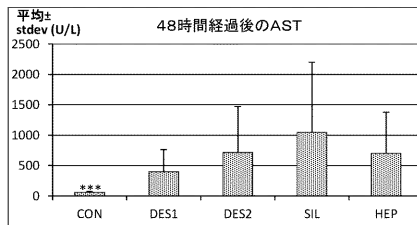
【図 2 7】



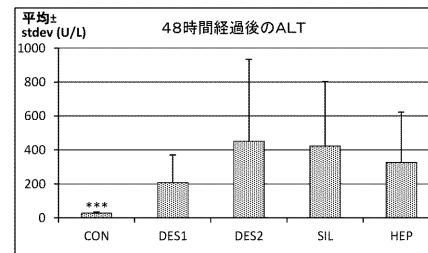
【図 28】



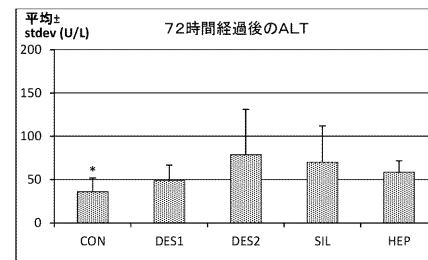
【図 29】



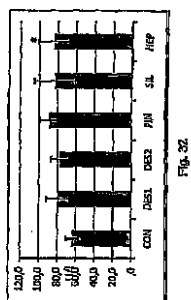
【図 30】



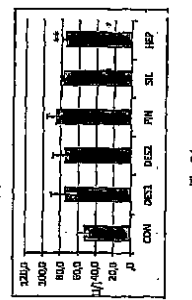
【図 31】



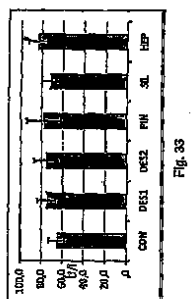
【図 32】



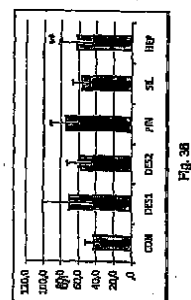
【図 34】



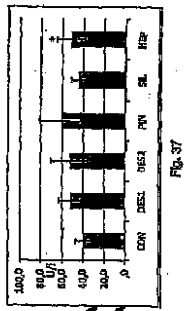
【図 33】



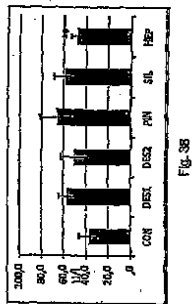
【図 36】



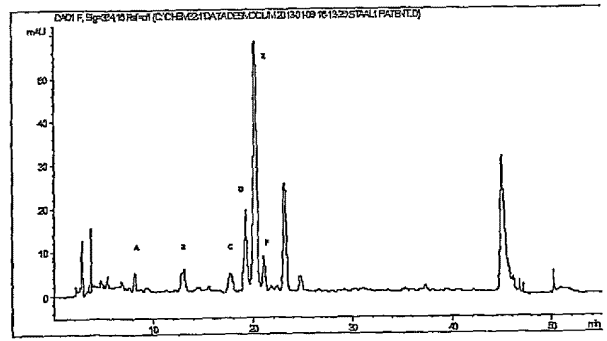
【図 37】



【図 38】

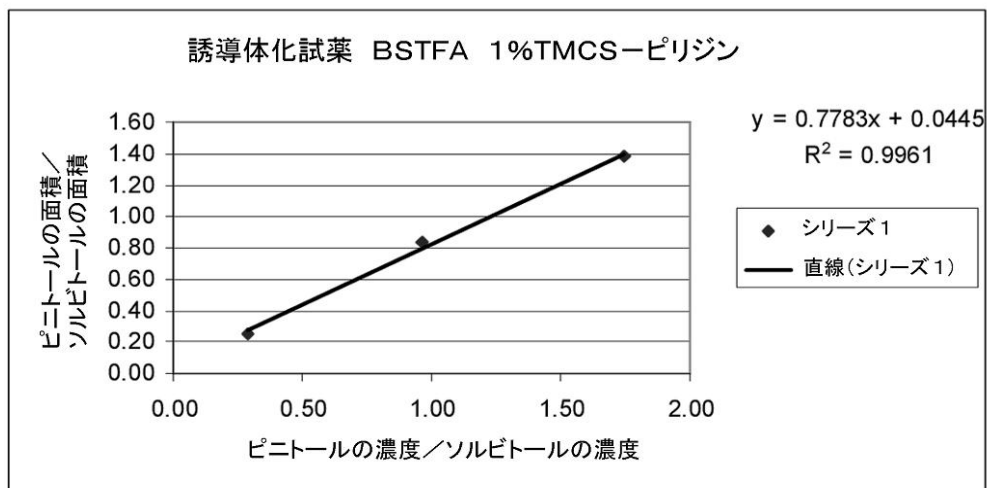


【図 41】

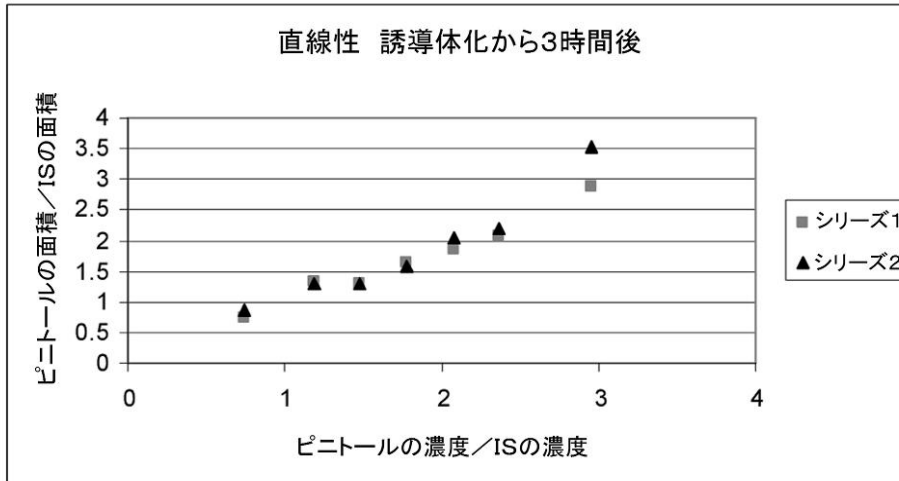


クロマトグラフィ・プロファイル

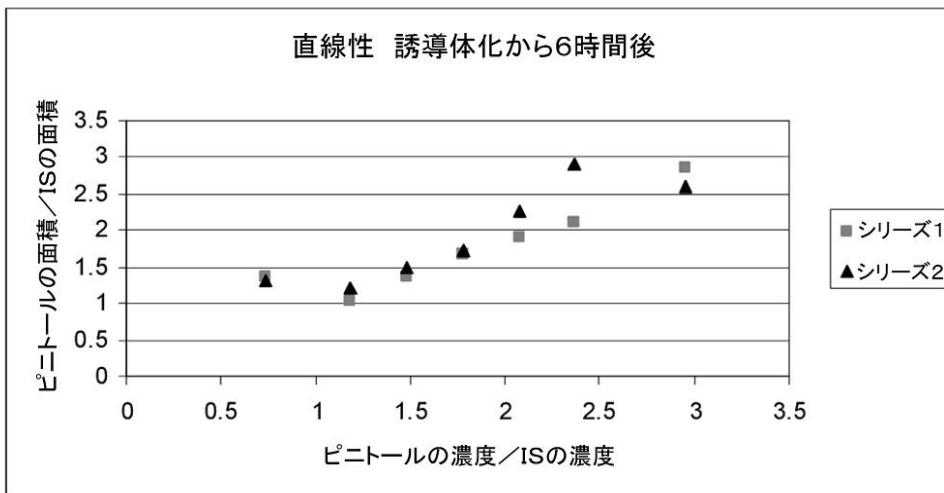
【図 4】



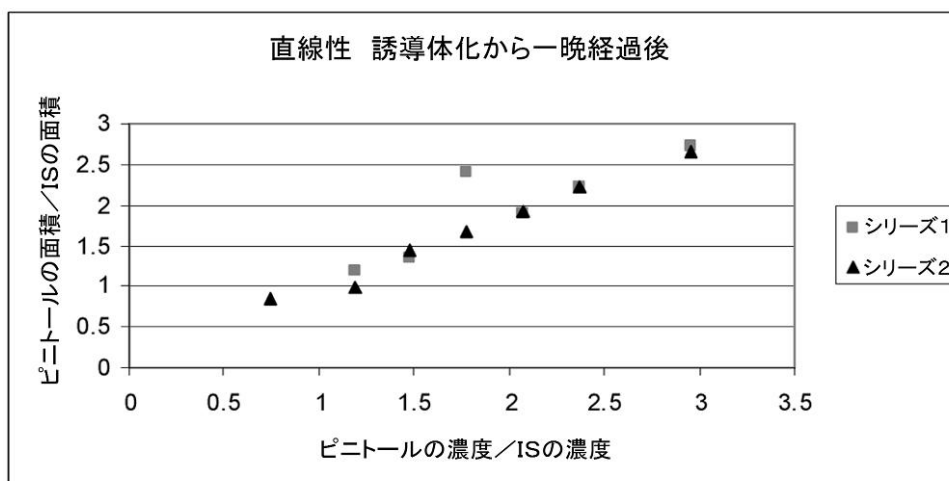
【 図 5 】



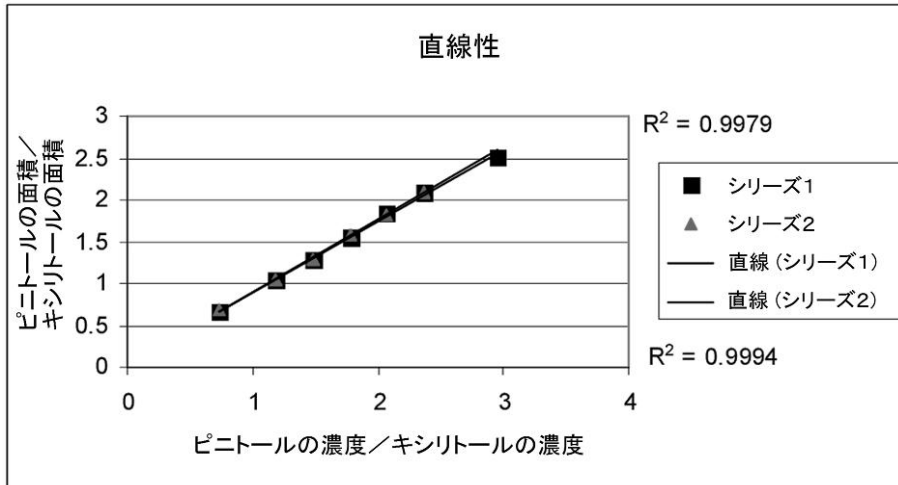
【 図 6 】



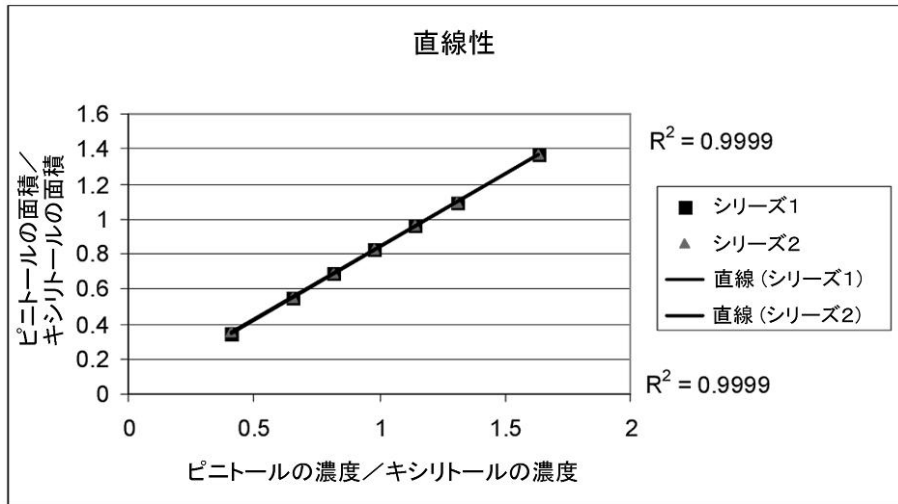
【 図 7 】



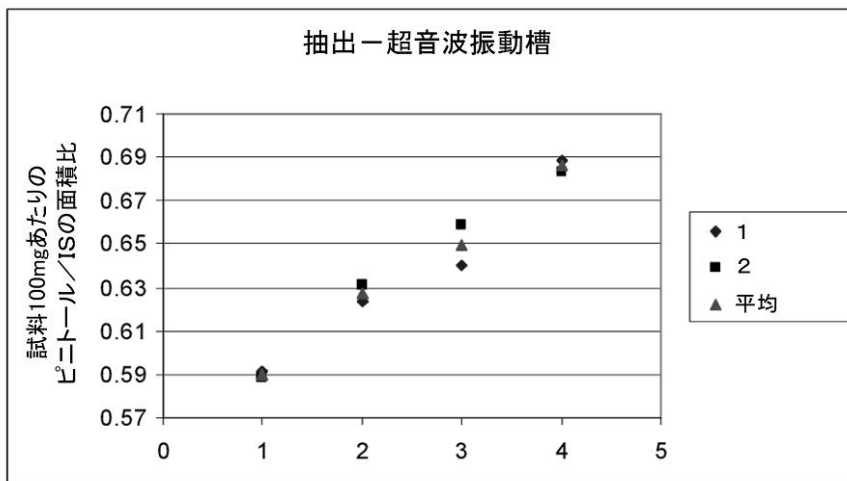
【 図 8 】



【 図 9 】

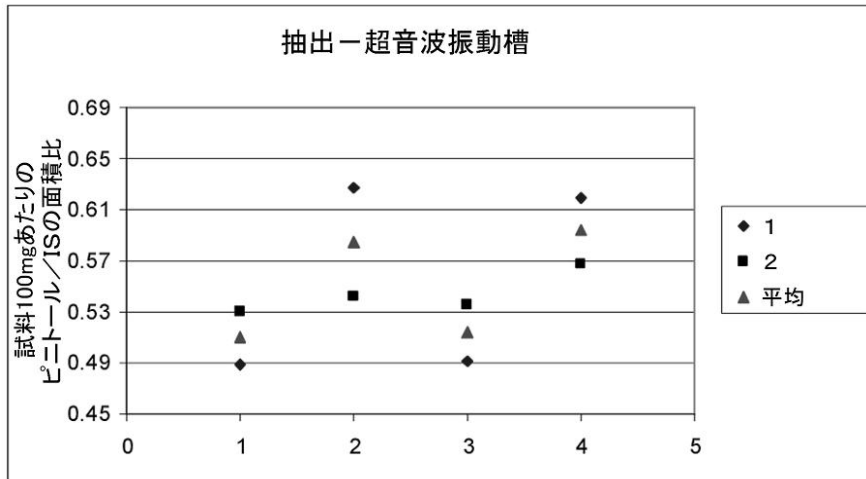


【 図 1 0 】

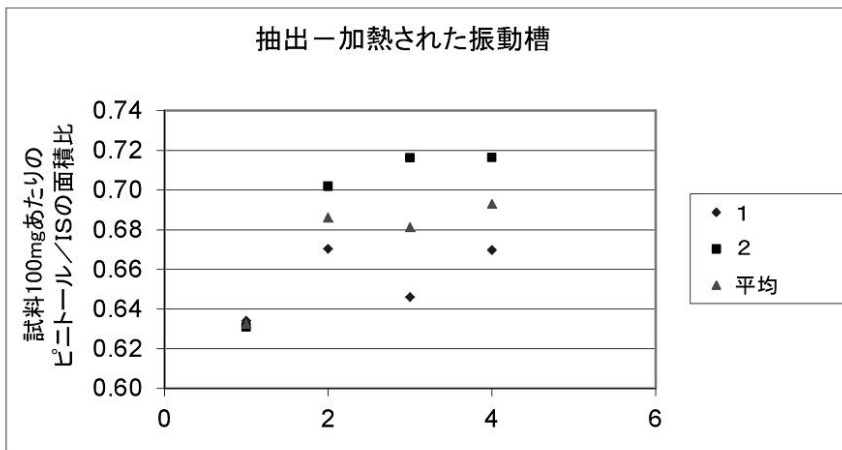




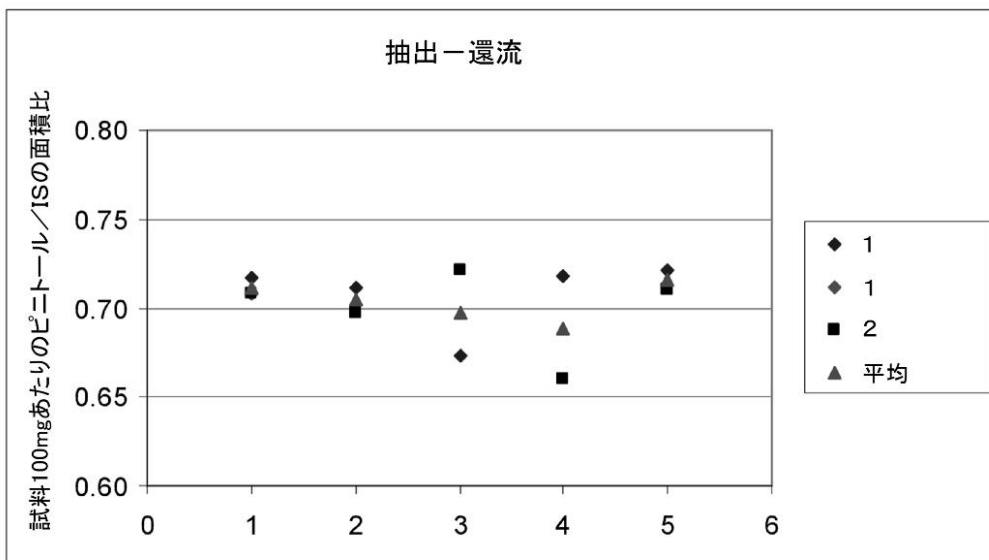
【図 1 1】



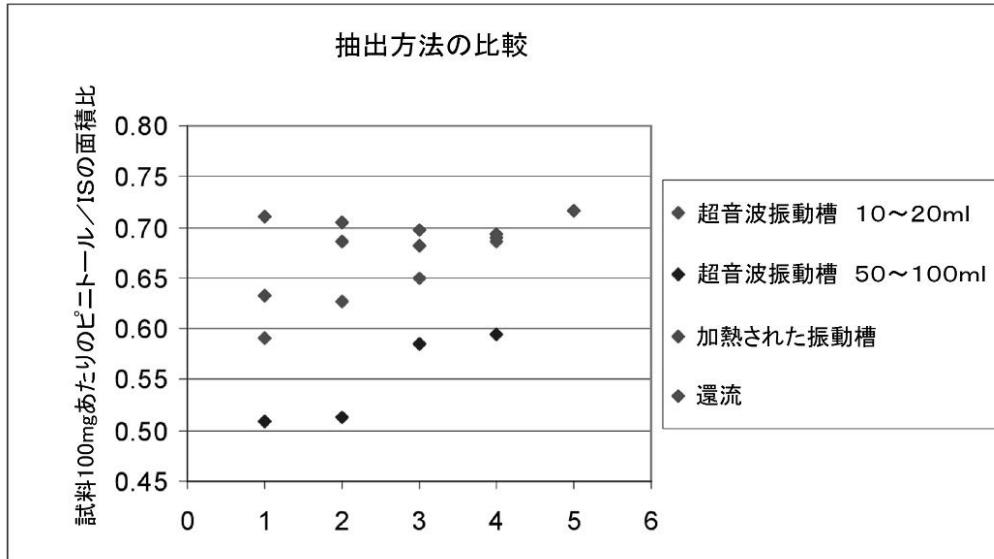
【図 1 2】



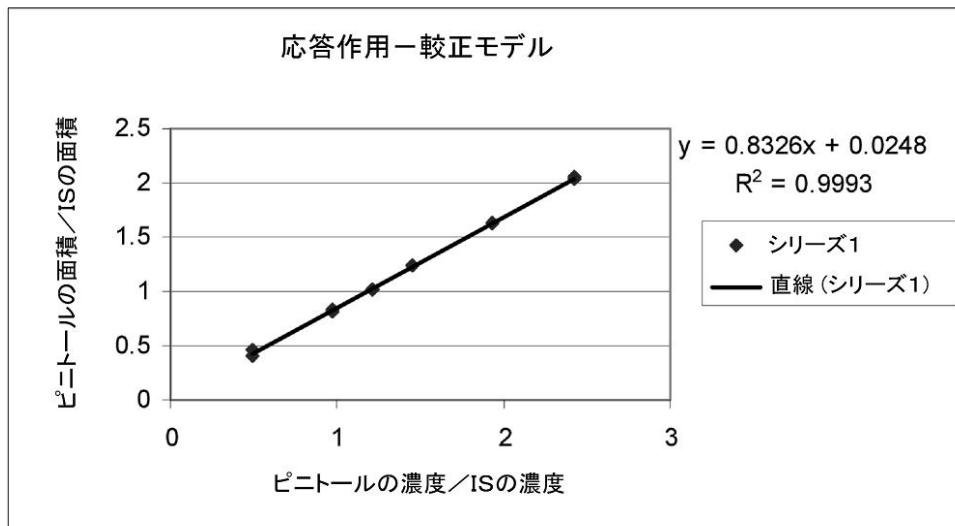
【図 1 3】



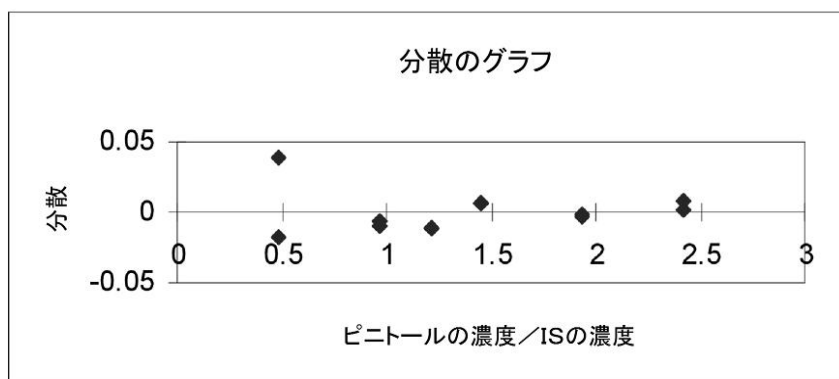
【図 1 4】



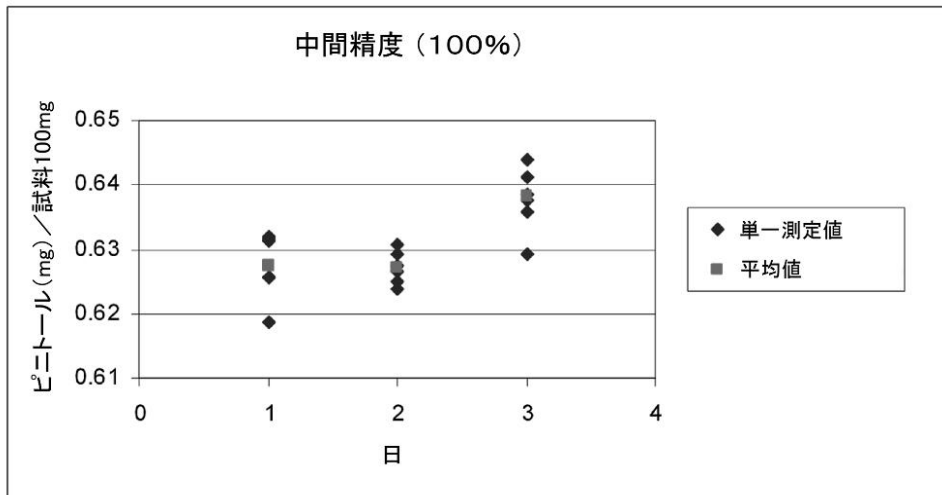
【図 1 5】



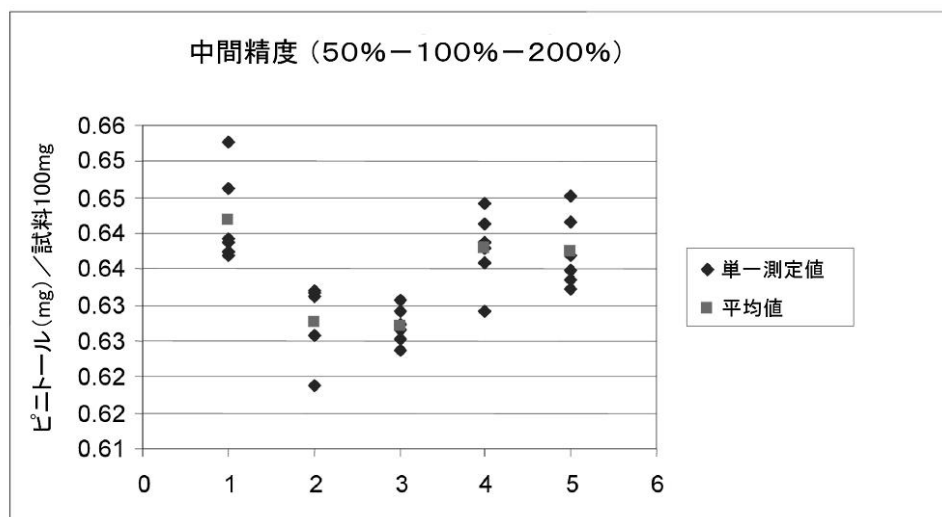
【図 1 6】



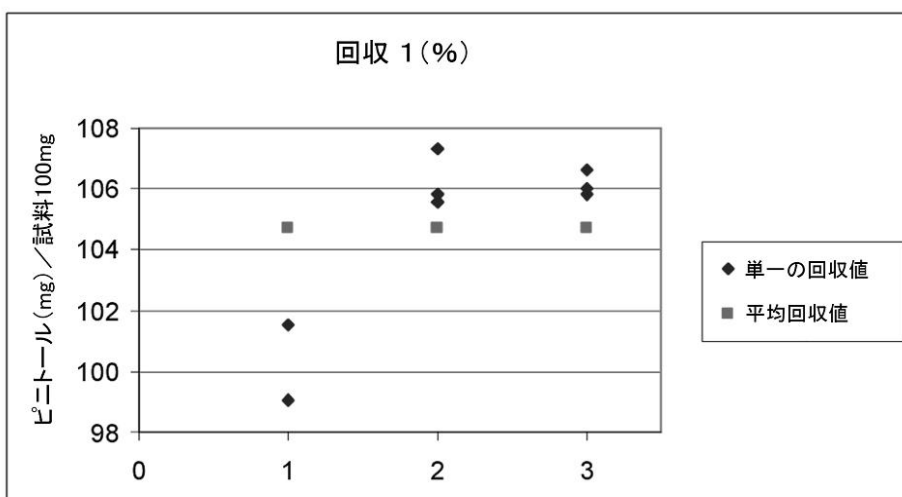
【 図 1 7 】



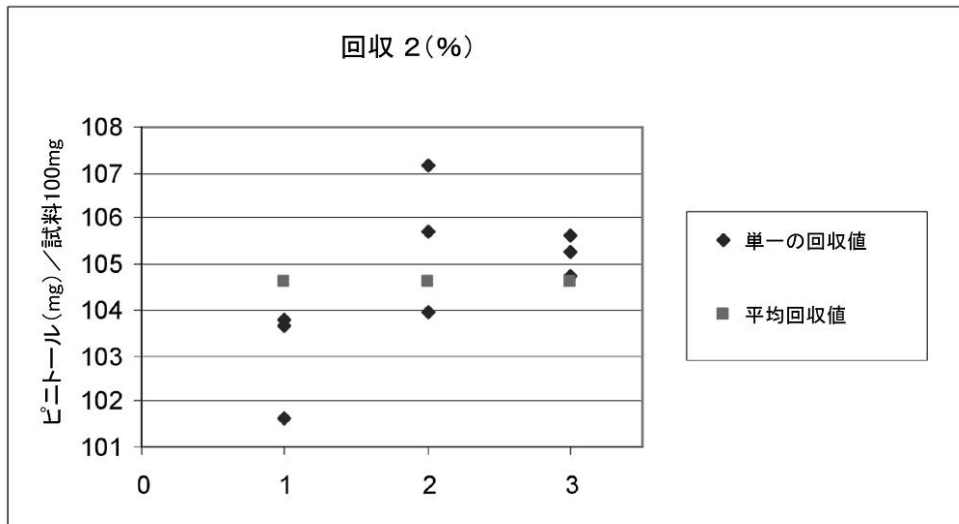
【 図 1 8 】



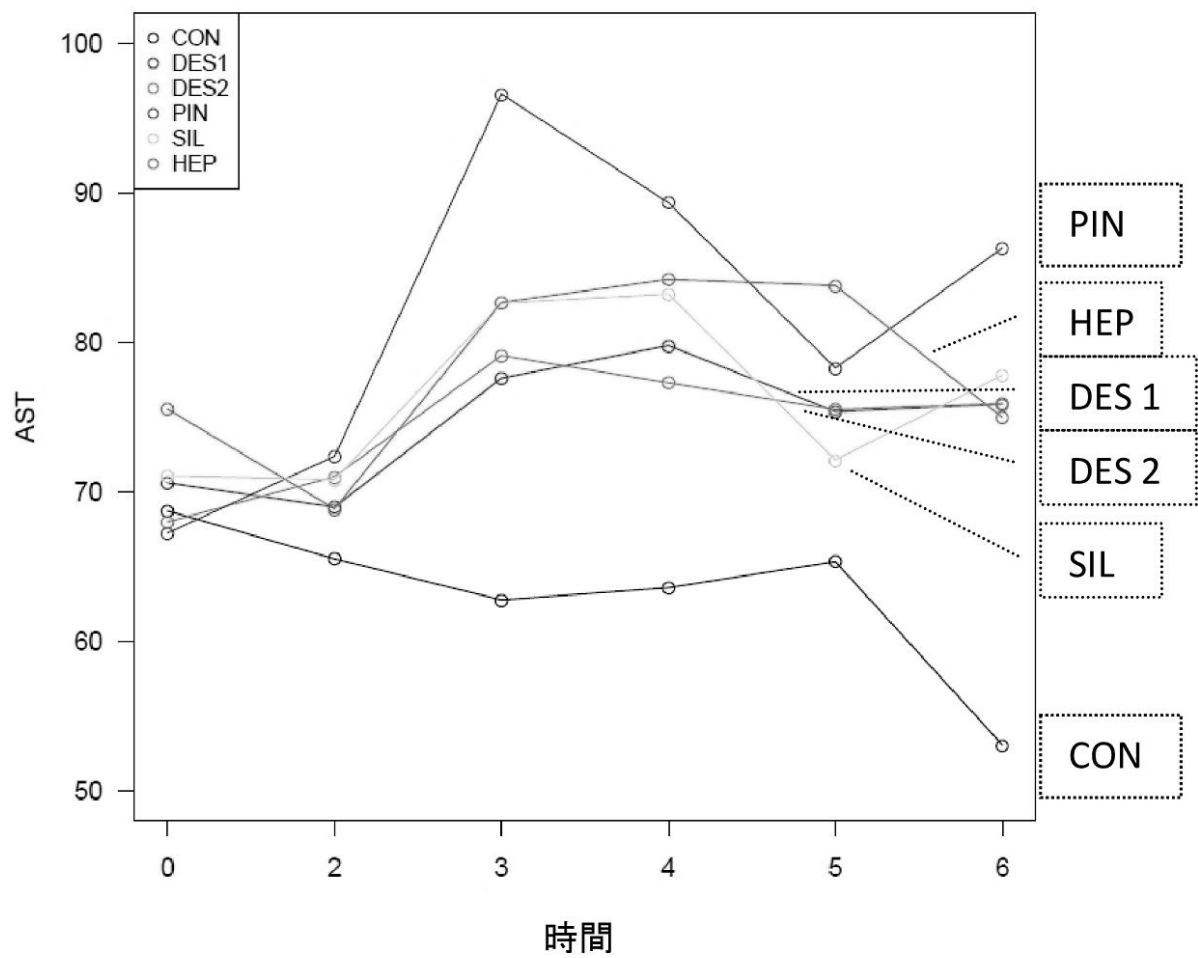
【 図 1 9 】



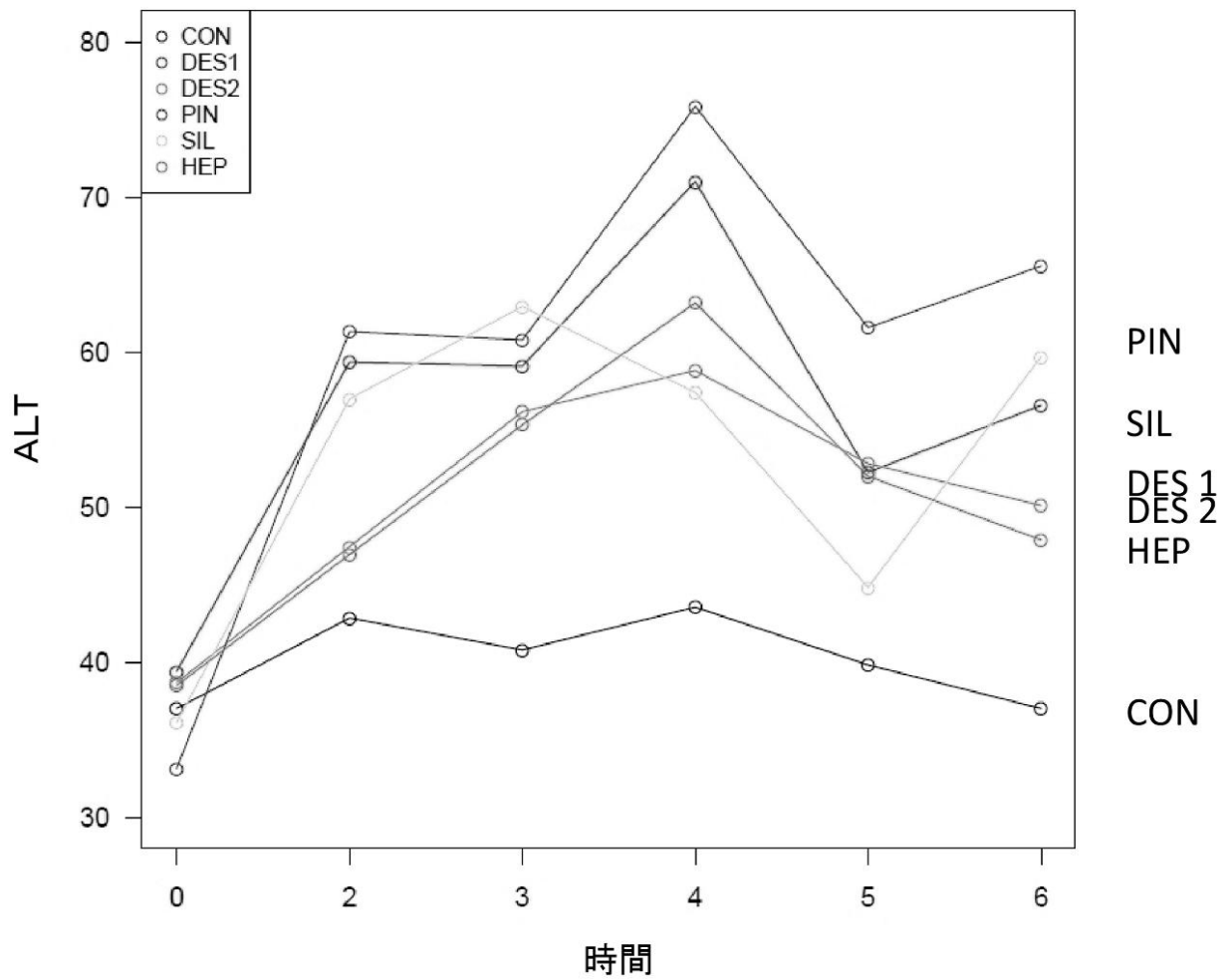
【図 20】



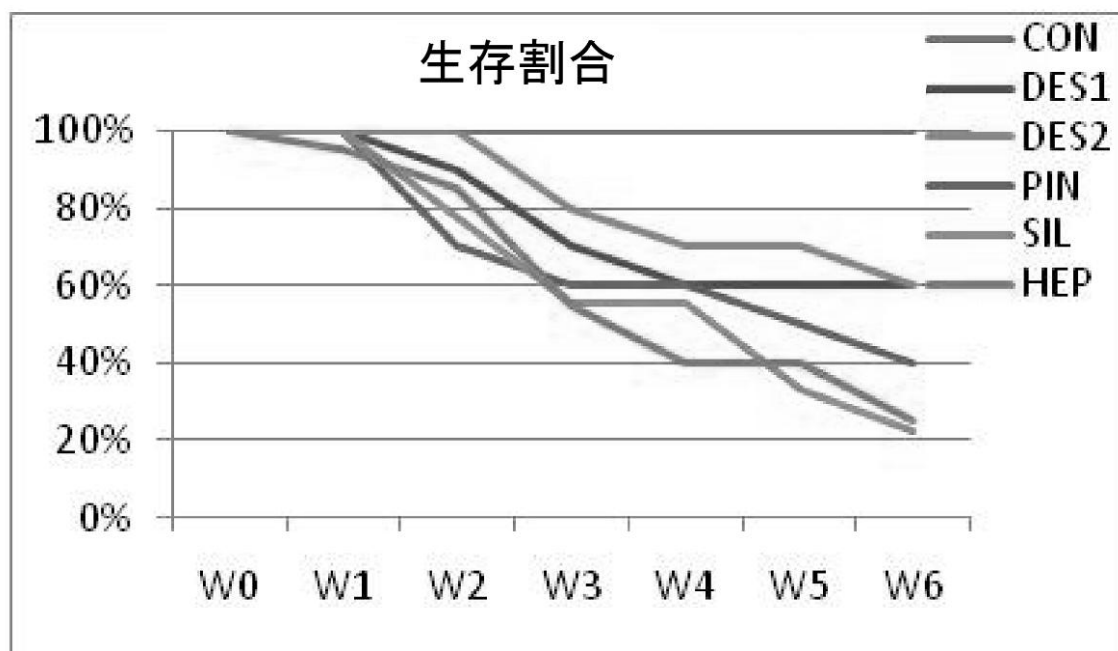
【図 35】



【図 39】



【図 40】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/BE2013/000014

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K36/48 A61P1/16 A61P3/10 A61K31/047 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, COMPENDEX, EMBASE, WPI Data, MEDLINE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 309 342 A1 (TUBERY PIERRE [FR]; TUBERY ANNE MARI [FR]) 29 March 1989 (1989-03-29) cited in the application page 2, line 21 - line 23 -----	1-22
A		23-46
A	WO 2004/084875 A1 (AMICOGEN INC [KR]; SHIN YONG CHUL [KR]; JEON YEONG JOONG [KR]; KIM JON) 7 October 2004 (2004-10-07) cited in the application abstract; claims 1-15; examples 1-6 ----- -/--	1-46
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 doubt 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		Date of mailing of the international search report
18 September 2013		27/09/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Vandenbogaerde, Ann

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/BE2013/000014

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MUANDA FRANÇOIS NSEMI ET AL: "Chemical Composition and, Cellular Evaluation of the Antioxidant Activity of Desmodium adscendens Leaves.", EVIDENCE-BASED COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE : ECAM 2011, vol. 2011, 620862, 2011, pages 1-9, XP002687208, ISSN: 1741-4288	1-22
A	abstract * p. 2, col. 1, 3 * * p. 2, col. 2, 2.4 and 2.5 * * p. 6, 3.3 * * p. 7, col. 1,- col. 2 * -----	23-46
A	BEVERIDGE R J ET AL: "POLY SACCHARIDES OF TROPICAL PASTURE HERBAGE PART 7 IDENTIFICATION OF A NEW PINITOL GALACTOSIDE FROM SEEDS OF TRIFOLIUM-SUBTERRANEUM SUBTERRANEAN CLOVER AND ANALYSIS OF SEVERAL PASTURE LEGUME SEEDS FOR CYCLO HEXITOLS AND THEIR GALACTOSIDES", AUSTRALIAN JOURNAL OF CHEMISTRY, vol. 30, no. 7, 1977, pages 1583-1590, XP009164693, ISSN: 0004-9425 * p. 1590, Determination of ... Legume Seeds *; tables 3, 4 -----	1-46
A	FORD C W: "IN-VITRO DIGESTIBILITY AND CHEMICAL COMPOSITION OF 3 TROPICAL PASTURE LEGUMES DESMODIUM-INTORTUM CULTIVAR GREENLEAF DESMODIUM-TORTUOSUM AND MACROPTILIUM-ATROPURPUREUM CULTIVAR SIRATRO", AUSTRALIAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH, vol. 29, no. 5, 1978, pages 963-974, XP009164678, ISSN: 0004-9409 abstract * Table 1 : D-pinitol * * p. 966-7, bridging sentence * ----- -/--	1-46

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/BE2013/000014

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE CA [Online]            CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS,            OHIO, US;            31 December 2007 (2007-12-31),            MAO, SHAOCHUN ET AL: "Chemical components            of <i>Desmodium microphyllum</i> (Thunb.)            DC.",            XP002687209,            retrieved from STN            Database accession no. 150:430895            abstract</p> <p>-----</p>	1-46
A	<p>DATABASE NAPRALERT [Online]            31 December 1982 (1982-12-31),            ADINARAYANA D ET AL: "OCCURRENCE OF A RARE            DIHOLOSYLFLAVONE, 2"-O-GLUCOSYLVITEXIN            IN",            XP002687210,            retrieved from STN            Database accession no. 92:74782            abstract</p>	1-46
A	<p>&amp; ADINARAYANA D ET AL: "OCCURRENCE OF A            RARE DIHOLOSYLFLAVONE,            2"-O-GLUCOSYLVITEXIN IN",            CURR SCI 51 P. 936-937.,            1982,            the whole document</p> <p>-----</p>	1-46
A	<p>NARAYANAN C R ET AL: "PINITOL - A NEW            ANTI-DIABETIC COMPOUND FROM THE LEAVES OF            BOUGAINVILLEA SPECTABILIS",            CURRENT SCIENCE,            vol. 56, no. 3,            5 February 1987 (1987-02-05), pages            139-141, XP000577900,            INDIAN ACADEMY OF SCIENCES, IN            ISSN: 0011-3891            the whole document</p> <p>-----</p>	1-46



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/BE2013/000014

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0309342	A1	29-03-1989	DE 3867781 D1 27-02-1992
			EP 0309342 A1 29-03-1989
			ES 2038777 T3 01-08-1993
			FR 2620939 A1 31-03-1989
-----			
WO 2004084875	A1	07-10-2004	AT 549026 T 15-03-2012
			EP 1605926 A1 21-12-2005
			JP 4422685 B2 24-02-2010
			JP 2006521291 A 21-09-2006
			KR 20040084168 A 06-10-2004
			US 2007098826 A1 03-05-2007
			WO 2004084875 A1 07-10-2004
-----			

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>A 6 1 P 39/06 (2006.01)</b>		<b>A 6 1 P 39/06</b>		
<b>A 6 1 P 25/32 (2006.01)</b>		<b>A 6 1 P 25/32</b>		
<b>A 6 1 P 3/04 (2006.01)</b>		<b>A 6 1 P 3/04</b>		
<b>A 6 1 P 3/10 (2006.01)</b>		<b>A 6 1 P 3/10</b>		
<b>A 2 3 L 1/30 (2006.01)</b>		<b>A 2 3 L 1/30</b>	<b>B</b>	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 プリーティンク、アーノルド  
 ベルギー王国、ペー - 2 9 2 0 カルムトハウト、ボスワフテルスドレーフ 2 6  
 (72) 発明者 アーペルス、サンドラ  
 ベルギー王国、ペー - 2 8 7 0 プールス、ハイデ 4 9  
 (72) 発明者 ヘルマンス、ニナ  
 ベルギー王国、ペー - 2 9 8 0 ズーアーセル、ヤハトホールンラーン 1 2

F ターム(参考) 4B018 LB08 LB10 MD61 ME03 ME14 MF01 MF06 MF07  
 4C086 AA01 AA02 EA11 GA17 MA01 MA04 MA52 NA14 ZA70 ZA75  
 ZC35 ZC39 ZC80  
 4C088 AB59 AC02 AC03 AC04 AC05 AC06 AC10 BA07 BA08 BA09  
 BA10 BA11 CA03 CA05 CA06 CA10 CA11 MA52 NA14 ZA70  
 ZA75 ZC35 ZC39 ZC80  
 4C206 AA01 AA02 CA25 KA18 MA01 MA04 MA72 NA14 ZA70 ZA75  
 ZC35 ZC39 ZC80