

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第6306825号
(P6306825)

(45) 発行日 平成30年4月4日 (2018.4.4)

(24) 登録日 平成30年3月16日 (2018.3.16)

(51) Int.Cl. F I

A 6 1 K 31/047 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 K 9/14 (2006.01)

A 6 1 K 9/16 (2006.01)

A 6 1 K 9/20 (2006.01)

A 6 1 K 31/047

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 K 9/14

A 6 1 K 9/16

A 6 1 K 9/20

請求項の数 8 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-91428 (P2013-91428)	(73) 特許権者	000189659
(22) 出願日	平成25年4月24日 (2013.4.24)		上野製薬株式会社
(65) 公開番号	特開2014-129322 (P2014-129322A)		大阪府大阪市中央区高麗橋2丁目4番8号
(43) 公開日	平成26年7月10日 (2014.7.10)	(74) 代理人	100081422
審査請求日	平成28年4月21日 (2016.4.21)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	特願2012-263314 (P2012-263314)	(74) 代理人	100084146
(32) 優先日	平成24年11月30日 (2012.11.30)		弁理士 山崎 宏
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100106518
			弁理士 松谷 道子
		(72) 発明者	山本 博
			石川県金沢市角間町ヌ7番地 国立大学法人金沢大学内
		(72) 発明者	棟居 聖一
			石川県金沢市角間町ヌ7番地 国立大学法人金沢大学内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 終末糖化産物生成抑制剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ソルビトールを有効成分として含有する 3 - デオキシグルコソン生成抑制用組成物であって、該組成物が、錠剤、カプセル剤、顆粒剤および散剤からなる群より選ばれる剤形である、組成物。

【請求項 2】

カプセル剤である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

該ソルビトールが該組成物において 40 重量%以上である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

該ソルビトールが該組成物において単独の有効成分である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 5】

糖類含有量が 5 g 以上であり、且つアミノ酸含有量および/または蛋白質含有量が 20 g 以上である食事の食前、食中、食後および食間のいずれかに投与されるものである、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 6】

組成物が機能性飲食品である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 7】

組成物がサプリメントである、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 8】

ソルビトールを飲食品に配合または添加することを特徴とする、3 - デオキシグルコソ生成抑制用機能性飲食品の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ソルビトールを有効成分とする終末糖化産物生成抑制剤、ならびにソルビトールを有効成分として含む、糖尿病もしくは糖尿病合併症の予防および/または治療のための医薬組成物に関する。

10

【背景技術】

【0002】

アミノ酸と還元糖の混合物を加熱すると褐変する現象は、一般にメイラード反応と呼ばれ、食品分野では、食品の加熱処理や貯蔵中に生じる現象として知られている。メイラード反応は、生体内においても発生しており、1968年にはグリコシルヘモグロビン(HbA1c)が生体内で同定されたことにより、糖尿病や老化の進行に伴い蛋白質の糖化反応が進行することが明らかにされた。そして、近年では、蛋白質の糖化反応における終末糖化産物(Advanced glycation end products、以下「AGEs」とも称する)が糖尿病合併症や動脈硬化といった生活習慣病の発症や老化の進行に関与することが報告されている(非特許文献1~3)。AGEsは特定の物質を指すものではなく、その全容は未だ解明されていないが、蛍光性や架橋構造の有無によって、

20

【0003】

生体内における蛋白質糖化反応の詳細は明らかとなっていないが、蛋白質に存在するアミノ基と還元糖に存在するアルデヒド基が反応し、 Schiff 塩基を形成した後、安定なアマドリ化合物が生成され、さらに長期の反応を経て、該アマドリ化合物から種々のAGEsが生成されると考えられている。アマドリ化合物からのAGEsの生成過程において、3 - デオキシグルコソン(以下、「3 - DG」とも称する)、グリオキサール、メチルグリオキサール等のジカルボニル化合物が中間体として生成することが知られている。これら中間体の中でも3 - DGはアミノ基との反応性が極めて高く、且つ最も生成量が多いことから、重要な中間体と考えられている。また、糖尿病患者においては、血清3 - DG値が高いほど合併症の進行が速いとの報告もある(非特許文献4)。したがって、AGEsの生成抑制のために3 - DGの生成を抑制することが特に注目されている。

30

【0004】

3 - DGの生成抑制に着目した技術としては、3 - DG等の初期グリコシル化産物のカルボニル基と反応して標的蛋白質の後期グリコシル化を抑制する、アミノグアニジン等の化合物を含むメイラード反応阻害剤が開示されている(特許文献1)。アミノグアニジンは当該技術分野における医薬品の開発において最も研究されている物質であるが、肝障害等の副作用を有することが確認されており、そのため、実用化には至っていない。

【0005】

40

その他にも、ガンピールノキやシラカバ等の植物抽出物により3 - DGの生成反応を阻害するメイラード反応阻害剤(特許文献2)、グリオキサラーゼI活性を備える酵素およびカルボニル化合物還元剤を有効成分とする3 - DGの消去によるカルボニルストレス改善剤(特許文献3)、パラバン酸誘導体を有効成分とする3 - DG生成阻害剤(特許文献4)、スルフィド化合物を有効成分とするデオキシグルコソ生成抑制剤(特許文献5)などが知られている。しかし、これらはいずれも有効性や安全性の点に課題を残すものであった。

【0006】

そこで、種々の疾患の発症や悪化に関与するAGEsの生成抑制のために利用することができ、かつ、重篤な副作用を有さない安全性の高い薬剤が求められている。

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特公平6-67827号公報

【特許文献2】特許第4195840号公報

【特許文献3】特許第4812996号公報

【特許文献4】特開平10-182460号公報

【特許文献5】特開2007-261983号公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】The Journal of Clinical Investigation, 1993, vol.91, pp.2470-2478

【非特許文献2】The New England Journal of Medicine, 1991, vol.325, pp.836-842

【非特許文献3】The Biochemical Journal, 2000, vol.350, pp.381-387

【非特許文献4】Diabetes Care, 2003, vol.26, pp.1889-1894

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、種々の生活習慣病の要因物質と考えられているAGEsの生成を抑制することができる物質を含み、生活習慣病、特に糖尿病もしくは糖尿病合併症の予防および／または治療に有用であり且つ副作用の少ないAGEs生成抑制剤を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、鋭意検討の結果、ソルビトールがAGEsの生成およびAGEs生成反応の中間体である3-DGの生成を抑制する作用を有することを見出し、本発明を完成させた。

【0011】

すなわち本発明は、ソルビトールを有効成分として含有する終末糖化産物生成抑制剤（以下、「本発明のAGEs生成抑制剤」とも称する）を提供する。

【0012】

本発明はまた、ソルビトールを有効成分として含有する3-デオキシグルコソン生成抑制剤（以下、「本発明の3-DG生成抑制剤」とも称する）を提供する。

【0013】

本発明はさらに、ソルビトールを有効成分として含む、糖尿病もしくは糖尿病合併症の予防および／または治療のための医薬組成物（以下、「本発明の糖尿病予防／治療用医薬組成物」とも称する）を提供する。

【0014】

本発明はさらに、非ヒト動物における糖尿病もしくは糖尿病合併症の予防および／または治療のための、ソルビトールを含む非ヒト動物用医薬組成物、該医薬組成物または本発明のAGEs生成抑制剤もしくは3-DG生成抑制剤を非ヒト動物に投与することを含む、非ヒト動物における糖尿病もしくは糖尿病合併症を予防および／または治療する方法、本発明のAGEs生成抑制剤または3-DG生成抑制剤を飲食品に配合または添加することと特徴とする機能性飲食品の製造方法、ならびにサプリメントの製造のための本発明のAGEs生成抑制剤または3-DG生成抑制剤の使用を提供する。

【発明の効果】

【0015】

AGEs、およびAGEsの生成反応における主要な中間体である3-DGは、種々の生活習慣病との関連が示唆されている物質であり、特に、糖尿病およびその合併症の発症および／または進行に深く関与するものである。したがって、本発明者らによりAGEs

10

20

30

40

50

および 3 - D G の生成を抑制する作用が見出されたソルビトールは、糖尿病もしくは糖尿病合併症の予防および / または治療のための、副作用の少ない医薬組成物の有効成分として有用である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 6 】

本発明の A G E s 生成抑制剤、3 - D G 生成抑制剤および糖尿病予防 / 治療用医薬組成物の有効成分であるソルビトールは、公知の製造方法により製造されたものであってもよく、市販のソルビトール製品であってもよい。ソルビトールの製造方法としては、例えば、ぶどう糖液を触媒存在下で高圧接触還元することで水素添加し、精製、濃縮する方法が例示される。市販のソルビトール製品としては、上野製薬株式会社製のソルパート、ソル

10

【 0 0 1 7 】

本発明において使用するソルビトールの性状は、液体状または固体状のいずれであってもよく、例えば、液体状ソルビトールから公知の粉末化方法または結晶化方法により製造された、粉末状ソルビトールまたは結晶ソルビトールであってもよい。使用するソルビトールの性状は、目的とする剤形に応じて適宜選択することができる。

【 0 0 1 8 】

本発明において使用するソルビトールの純度としては、液体状ソルビトールであれば純度 4 5 % 以上のものが好ましい。また、粉末状ソルビトールであれば純度 8 0 % 以上のものが好ましく、純度 8 5 % 以上のものがより好ましく、純度 8 8 % 以上のものがさらに好

20

【 0 0 1 9 】

本発明の A G E s 生成抑制剤および 3 - D G 生成抑制剤はいずれも、有効成分としてソルビトールを含有するものであればよく、ソルビトールによる A G E s 生成抑制効果または 3 - D G 生成抑制効果を妨げない限り、さらに賦形剤等を含むものであってもよい。したがって、本発明の A G E s 生成抑制剤または 3 - D G 生成抑制剤中のソルビトールの割合は特に限定されない。例えば、本発明の A G E s 生成抑制剤または 3 - D G 生成抑制剤は、ソルビトールを 4 0 重量 % 以上、4 5 重量 % 以上、5 0 重量 % 以上、6 0 重量 % 以上、7 0 重量 % 以上、8 0 重量 % 以上、8 5 重量 % 以上、9 0 重量 % 以上、9 5 重量 % 以上または 9 8 重量 % 以上含むものであり得る。あるいは、本発明の A G E s 生成抑制剤または 3 - D G 生成抑制剤は、ソルビトールのみからなるものであってもよい。一つの態様において、ソルビトールは、本発明の A G E s 生成抑制剤または 3 - D G 生成抑制剤における単独の有効成分である。

30

【 0 0 2 0 】

本発明の A G E s 生成抑制剤は、ペントシジン、クロスリン、ピロピリジン、グリオキサール由来リジンダイマー (G O L D)、メチルグリオキサール由来リジンダイマー (M O L D) 等の蛍光性 A G E s およびピラリン、カルボキシメチルリジン (C M L)、3 - デオキシグルコソン由来リジンダイマー (D O L D)、イミダゾロン化合物等の非蛍光性 A G E s を含む種々の A G E s の生成を抑制することができる。一つの態様において、本発明の A G E s 生成抑制剤は、蛍光性 A G E s であるペントシジンの生成抑制のために用

40

。

【 0 0 2 1 】

本発明の 3 - D G 生成抑制剤は、3 - D G の生成抑制を介して、A G E s のうち主として 3 - D G から生じるピロピリジン、ピラリン、D O L D、イミダゾロン、3 - D G イミダゾロン等の生成を特に効果的に抑制することができる。

【 0 0 2 2 】

本発明の糖尿病予防 / 治療用医薬組成物は、本発明の A G E s 生成抑制剤および 3 - D G 生成抑制剤と同様、有効成分としてソルビトールを含有するものである。

50

【0023】

本発明の糖尿病予防／治療用医薬組成物中に有効成分として含有させるソルビトールの割合は、目的とする剤形等に応じて適宜設定することができるが、通常、医薬組成物全量に対し1～98重量％程度であればよく、2～95重量％程度であることが好ましく、3～90重量％程度であることがより好ましい。一つの態様において、ソルビトールは、本発明の糖尿病予防／治療用医薬組成物における単独の有効成分である。

【0024】

本発明の好ましい態様において、糖尿病もしくは糖尿病合併症の予防および／または治療は、3-デオキシグルコソンまたは終末糖化産物の生成抑制を介するものである。

【0025】

本明細書において、糖尿病もしくは糖尿病合併症の「治療」には、既に糖尿病もしくは糖尿病合併症に罹患している患者における症状の進行を阻止することも含まれる。

【0026】

本発明の糖尿病予防／治療用医薬組成物の投与方法は、経口投与または非経口投与のいずれであってもよい。また、該組成物の投与時期は特に限定されず、食前、食中、食後、食間のいずれであってもよい。例えば、該組成物は、糖類含有量が5g以上である食事、またはアミノ酸および／または蛋白質含有量が20g以上である食事の食前、食中、食後および食間のいずれかに投与するのが好ましく、糖類ならびにアミノ酸および／または蛋白質を前記含有量以上含有する食事の食前、食中、食後および食間のいずれかに投与するのがより好ましい。食事に含まれるアミノ酸としては、リジン、アルギニン等が挙げられ、その中でもAGES化し易いリジンおよび／またはアルギニンを前記含有量以上含有する食事の食前、食中、食後および食間のいずれかに該組成物を投与するのが好ましい。また、食事に含まれる蛋白質としては、卵白アルブミン、乳アルブミン、グリアジン、乳カゼイン、大豆カゼイン等が挙げられ、その中でもAGES化し易い卵白アルブミン、乳アルブミンおよび乳カゼインから選ばれる1種以上を前記含有量以上含有する食事の食前、食中、食後および食間のいずれかに該組成物を投与するのが好ましい。経口投与の場合には、多量のソルビトールによる下痢の副作用回避の点で、該組成物を食後に投与するか、または一日に複数回に分けて少量ずつ投与するのが特に好ましい。ここで、一般的に「食事」とは、生存に必要な栄養分をとるために毎日の習慣として物を食べる（飲食行為）あるいはその飲食物を意味するが、本明細書において用いる「食事」の用語は、一回の飲食行為において摂取する一まとまりの飲食物を意味するものとする。

【0027】

本明細書において用いる場合、「糖類」とは、単糖および／または二糖を意味するものとする。これに対し「糖質」とは、炭水化物のうち食物繊維以外のものをいい、糖類の他に、オリゴ糖、多糖、糖アルコール等が含まれる。

【0028】

本発明の糖尿病予防／治療用医薬組成物の投与量は、糖尿病またはその合併症の程度、その他の疾病の程度、年齢、性別等の条件に応じて適宜選択される。該組成物は、AGESの生成を抑制することができる量（以下、「AGES生成抑制有効量」とも称する）あるいはAGESの前駆体である3-DGの生成を抑制することができる量（以下、「3-DG生成抑制有効量」とも称する）を投与すればよい。AGES生成抑制有効量および3-DG生成抑制有効量は、当業者に周知の方法（各種の非臨床および／または臨床試験を含む）を用いて適宜決定することができる。

【0029】

本発明の糖尿病予防／治療用医薬組成物は、AGES生成抑制有効量または3-DG生成抑制有効量のソルビトールを一度に投与するものであっても良く、間隔を置いて複数回に分けて投与するものであっても良い。経口投与の場合には、緩下性の点から複数回に分けて投与するのが好ましい。複数回に分けて投与する場合は、一日に投与されるソルビトールの合計量がAGES生成抑制有効量または3-DG生成抑制有効量となればよく、食事の回数に合わせて投与するのが好ましい。

【0030】

本発明の糖尿病予防／治療用医薬組成物は、糖尿病もしくは糖尿病合併症に罹患した者、または健常者のいずれに対しても投与することができる。特に糖尿病はA G E sおよびその前駆体である3 - D Gとの関連性が高いため、該組成物は糖尿病に罹患した者に対して投与するのが好ましい。糖尿病に罹患した者とは、ヘモグロビンA 1 cが6 . 1 % (J D S値) 以上で、且つ、以下の(1) ~ (3)のいずれかに該当する者を指す：(1)空腹時血糖値が1 2 6 m g / d L以上、(2)随時血糖値（空腹か食後かにかかわらず）が2 0 0 m g / d L以上、および(3)ブドウ糖負荷後2時間値が2 0 0 m g / d L以上。糖尿病診断基準の詳細は、日本糖尿病学会による「糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告」（同学会のホームページ等から入手可能）に記載されている。

10

【0031】

また、本発明の糖尿病予防／治療用医薬組成物は、糖尿病に伴って発症する糖尿病網膜症、糖尿病腎症、糖尿病神経障害、糖尿病血管合併症、動脈硬化症、腎不全、アルツハイマー病、神経変性疾患、がん等の糖尿病合併症の予防および／または治療のために用いることができる。これらの糖尿病合併症の中でも、発症率の高い糖尿病網膜症、糖尿病腎症および／または糖尿病神経障害の予防および／または治療のために該組成物を用いることが好ましい。

【0032】

さらに、本発明の糖尿病予防／治療用医薬組成物は、健常者に投与することにより、糖尿病およびその合併症を効果的に予防することができる。

20

【0033】

本発明の糖尿病予防／治療用医薬組成物は、ソルビトールによる糖尿病もしくは糖尿病合併症の予防および／または治療効果を妨げない範囲であれば、ソルビトールの他にさらに賦形剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、矯味剤、懸濁化剤、乳化剤、着香剤、溶解補助剤、着色剤、粘稠剤等の成分を添加して各種の剤形とすることができる。

【0034】

本発明の糖尿病予防／治療用医薬組成物の剤形としては、錠剤（口腔内崩壊錠、チュアブル錠、発泡錠、分散錠、溶解錠）、カプセル剤、顆粒剤（発泡顆粒剤）、散剤、経口服液剤（エリキシル剤、懸濁剤、乳剤、リモナーデ剤）、シロップ剤（シロップ用剤）、経口ゼリー剤、口腔用錠剤（トローチ剤、舌下錠、パッカル錠、付着錠、ガム剤）、口腔用スプレー剤、口腔用半固形剤、含嗽剤、注射剤（輸液剤、埋め込み注射剤、持続性注射剤）、透析用剤（腹膜透析用剤、血液透析用剤）、吸入剤（吸入粉末剤、吸入液剤、吸入エアゾール剤）、坐剤、直腸用半固形剤、注腸剤、点眼剤、眼軟膏剤、点耳剤、点鼻剤（点鼻粉末剤、点鼻液剤）、腔錠、腔用坐剤、外用固形剤（外用散剤）、外用液剤（リニメント剤、ローション剤）、スプレー剤（外用エアゾール剤、ポンプスプレー剤）、軟膏剤、クリーム剤、ゲル剤、貼付剤（テープ剤、パップ剤）等が挙げられる。これらの剤形中でも経口投与のし易さの点で、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、経口服液剤、シロップ剤、経口ゼリー剤、口腔用錠剤、口腔用スプレー剤、口腔用半固形剤および含嗽剤が好ましく、生体内に吸収され易い点で、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤がより好ましい。

30

【0035】

また、本発明の糖尿病予防／治療用医薬組成物は、エキス剤、丸剤、酒精剤、浸剤・煎剤、茶剤、チンキ剤、芳香水剤、流エキス剤等の生薬関連製剤に本発明のA G E s生成抑制剤または3 - D G生成抑制剤を添加した剤形で使用することもできる。これら剤形は、糖尿病またはその合併症の程度、その他の疾病の程度、年齢、性別等の条件に応じて適宜選択される。

40

【0036】

更に、本発明の糖尿病予防／治療用医薬組成物は、A G E s生成抑制効果を有する他の薬剤をさらに含むものとすることができる。これらの薬剤としては、例えば、インスリン抵抗性改善薬、脂質異常症治療薬、アンジオテンシンII 1型受容体拮抗薬、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、メトホルミン等が例示される。

50

【 0 0 3 7 】

また、本発明の糖尿病予防／治療用医薬組成物は、A G E s 生成抑制効果を有する天然物または天然由来物質をさらに含むものとすることもできる。これらの天然物または天然由来物質としては、例えば、ドクダミ、セイヨウサンザシ、カモミール、ブドウ葉等のハーブ類、桜の花、トウモロコシの花柱および柱頭、セイヨウオオバコ種子、マロニエ、シヤクヤク、バラの花、梅果実、山ぶどう、紫菊花、小麦胚芽、小麦胚芽由来のポリアミン、マンゴスチン等が例示される。

【 0 0 3 8 】

本発明のA G E s 生成抑制剤もしくは3 - D G 生成抑制剤またはその有効成分であるソルビトールは、非ヒト動物における糖尿病もしくは糖尿病合併症を予防および／または治療するために用いることもできる。したがって、本発明の一態様において、非ヒト動物における糖尿病もしくは糖尿病合併症の予防および／または治療のための、ソルビトールを含む非ヒト動物用医薬組成物（以下、本発明の非ヒト動物用医薬組成物とも称する）が提供される。また、該非ヒト動物用医薬組成物または本発明のA G E s 生成抑制剤もしくは3 - D G 生成抑制剤を非ヒト動物に投与することを含む、非ヒト動物における糖尿病もしくは糖尿病合併症を予防および／または治療する方法も提供される。非ヒト動物としては、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ等の家畜類や、イヌ、ネコ等のペットとして飼育される動物等が例示される。

【 0 0 3 9 】

本発明の非ヒト動物用医薬組成物に含有させるソルビトールの量、該医薬組成物の投与方法、投与時期、投与量および剤形、該医薬組成物においてソルビトールと併用可能な他の薬剤、天然物および天然由来物質、ならびに本発明のA G E s 生成抑制剤または3 - D G 生成抑制剤を非ヒト動物に投与する場合における投与方法、投与時期、投与量等については、「本発明の糖尿病予防／治療用医薬組成物」について上述した内容と同様である。

【 0 0 4 0 】

さらに、本発明のA G E s 生成抑制剤または3 - D G 生成抑制剤は、食品添加剤として用いることもできる。したがって、本発明のA G E s 生成抑制剤または3 - D G 生成抑制剤を飲食品に配合または添加することにより、A G E s または3 - D G の生成を抑制する機能性飲食品を提供することができる。また、本発明のA G E s 生成抑制剤または3 - D G 生成抑制剤を成分として使用することにより、A G E s または3 - D G の生成を抑制するサプリメントを製造することもできる。この場合、製造するサプリメントの剤形に応じて適宜、賦形剤等を配合することができる。

【 実施例 】

【 0 0 4 1 】

以下、実施例により本発明をさらに説明する。

【 0 0 4 2 】

試験例 1

(1) 試料の調製

アミノ酸、糖質およびリン酸緩衝液を表 1 に示す配合量で 5 0 m L のポリプロピレン製遠沈管に入れて密閉し、攪拌した後、3 7 ℃ で 4 2 日間、インキュベーター内で反応させた。そして反応物を 0 . 2 μ m フィルターで濾過し、得られた濾液を試料とした。尚、使用したアミノ酸および糖質は下記の通りである。

[アミノ酸]

リジン（N - (t - ブトキシカルボニル) - L - リジン、渡辺化学工業株式会社製）とアルギニン（N - (t - ブトキシカルボニル) - L - アルギニン、渡辺化学工業株式会社製）の 1 : 1 混合物

[糖質]

グルコース（試薬特級、和光純薬工業株式会社製）

フルクトース（ＫＣ特級、片山化学工業株式会社製）

ソルビトール（シグマアルドリッチジャパン特級、シグマアルドリッチジャパン合同会社製）

【 0 0 4 3 】

【表 1】

表 1

	アミノ酸 (g)	グルコース (g)	フルクトース (g)	ソルビトール (g)	リン酸緩衝液 (mL)
試験区 1	0.4	1.8	0	0	20
試験区 2	0.4	0	1.8	0	20
試験区 3	0.4	0	0	1.8	20

10

【 0 0 4 4 】

(2) 試験方法

上記のように調製した試料について、下記の方法によって 3 - D G、蛍光性 A G E s、ペントシジン、C M L、R A G E アゴニスト活性および R A G E アンタゴニスト活性を評価した。

20

【 0 0 4 5 】

(a) 3 - D G の定量

試料 2 m L に等量の 6 0 % 過塩素酸溶液を加えて除蛋白し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 4 m L で中和した後、2 , 3 - ジアミノナフタレンの 0 . 1 % メタノール溶液 0 . 8 m L を添加し、4 で 1 6 時間反応させた。次に反応物を 4 . 4 m L の酢酸エチルで抽出し、エバポレーターで濃縮乾固後、メタノール 5 m L に溶解させ、0 . 4 5 μ m フィルターで濾過した。濾過液を高速液体クロマトグラフィーに供試し、下記測定条件で 3 - D G を定量した。

[高速液体クロマトグラフィー測定条件]

U V : 2 6 8 n m

注入量 : 2 0 μ L

カラム : T S K - G E L , O D S - 8 0 T s (4 . 6 × 1 5 0 m m 、東ソー株式会社製)

カラム温度 : 3 0

移動相 : 5 0 m M リン酸 : メタノール : アセトニトリル = 7 : 1 . 5 : 1 . 5

流速 : 1 m L / 分

【 0 0 4 6 】

(b) 蛍光性 A G E s の定量

標準物質であるペリレン 2 . 5 m g を秤量し、脱気エタノール 5 0 m L を加えて十分に溶解させペリレン溶液を作製した。1 0 μ M の濃度まで希釈したペリレン溶液に波長 3 8 6 n m の励起光を当て、4 1 0 - 6 0 0 n m の範囲の蛍光強度を測定してエリアを算出した。一方で、試料には波長 3 8 0 n m の励起光を当て、4 0 0 - 6 0 0 n m の範囲の蛍光強度を測定してエリアを算出した。試料のエリア測定値は 1 0 μ M のペリレン溶液のエリアの値に対する相対値として蛍光性 A G E s を定量した。

40

【 0 0 4 7 】

(c) ペントシジンの定量

ペントシジン測定キット「F S K ペントシジン（登録商標）」（株式会社伏見製薬所）を用いて、以下の通りにペントシジン定量を行った：使用する 3 0 分以上前に試薬及びペントシジン固相化プレート常温に戻しておいた。試料希釈後、キット添付のペントシジン固相化プレートに試料を 5 0 μ L ずつ分注し、試薬のブランク値測定用ウェル以外に第

50

ー抗体溶液 50 μ L を分注した。プレートを 300 rpm で 1 分間振盪することにより試料と抗体溶液を混合した後、37 で 1 時間反応させた。次に反応液を捨て、洗浄液 200 μ L を分注してプレートを洗浄した。該洗浄は 3 回行った。プレートの水気を取り除いた後、試薬のブランク値測定用ウェル以外に第二抗体溶液 100 μ L を分注し、300 rpm で 1 分間の振盪により混合した後、25 で 1 時間反応させた。そして、反応液を捨て、再び洗浄液 200 μ L でプレートを 3 回洗浄した後、プレートの水気を取り、発色剤 100 μ L を分注して遮光条件下で 10 分間静置した。最後に反応停止液 100 μ L を分注し、分注後 10 分以内にマイクロプレートリーダーを用いて主波長 450 nm / 参照波長 630 nm で測定を行った。ペントシジン濃度は、試料の測定値に基づき、ペントシジン標準溶液の検量線を用いて決定した。

10

【0048】

(d) CML の定量

CircuLex CML / N - (carboxymethyl) lysine ELISA kit (株式会社サイクレックス製) を用いて、以下の通りに CML 定量を行った：使用する 30 分以上前に試薬及び CML 固相化ウェルを常温に戻しておいた。また CML - HSA スタンダード粉末品に超純水 (ミリQ 水) 1 mL を加えてマスタースタンダードを作製し、スタンダード希釈用バッファーで希釈を行いスタンダード 1 ~ 7 を作製した。試料は必要に応じてサンプル希釈用バッファーで希釈した。キット付属品でない 96 ウェルプレートに CML - HSA スタンダードと試料 60 μ L を分注した。次に、第一抗体粉末品に超純水 (ミリQ 水) を加え、サンプル希釈用バッファーで希釈して第一抗体溶液を作成し、該抗体溶液 60 μ L をプレートに分注して混合した。該混合液 100 μ L を CML 固相化ウェルに添加し、300 rpm で振盪させながら 25 で 1 時間反応させた。さらに反応液を捨て、洗浄液 350 μ L を分注してプレートを洗浄した。該洗浄は 4 回行った。プレートの水気を取り除いた後、第二抗体溶液 100 μ L を分注し、300 rpm で振盪させながら 25 で 1 時間反応させた。反応液を捨て、再び洗浄液 350 μ L で 4 回洗浄し、プレートの水気を取り、発色剤 100 μ L を分注した。そして 300 rpm で振盪させながら遮光条件下で 10 分間静置した。最後に反応停止液 100 μ L を分注し、分注後 30 分以内にマイクロプレートリーダーを用いて主波長 450 nm / 参照波長 595 nm で測定を行った。CML 濃度は、試料の測定値に基づき、CML 標準溶液の検量線を用いて決定した。

20

30

【0049】

(e) RAGE アゴニスト活性の評価

Luciferase Assay System (Promega) を用いて RAGE アゴニスト活性の評価を行った：(1 日目) Diabetes, 2006, vol. 55, pp. 2510 - 2522 に記載される方法に従い、pNF - B - Luc プラスミド (stratagene 社) とヒト RAGE プラスミド (全長ヒト RAGE cDNA を含む) を導入した C6 グリオーマ細胞を 96 ウェルプレートに 100 μ L / ウェルで播種し、細胞がコンフルエントになるまで CO₂ インキュベーターで培養した。培養には 10% FBS / DMEM 培地を使用した。(2 日目) 培地を除去し、無血清 DMEM 培地 300 μ L でウェル内を洗浄後、0.1% FBS / DMEM 培地 100 μ L をゆっくり添加した。その後、CO₂ インキュベーターで一晩培養した。(3 日目) 培地を用いて試料を希釈し、各ウェルに希釈した試料 50 μ L を添加した。また、対照のウェルにはグリセルアルデヒドで AGE 化された AGE - BSA (50 μ g / mL) を添加した。CO₂ インキュベーターで 4 時間培養後、培地を除去して PBS (-) 300 μ L でウェル内を 2 回洗浄した。そして氷上で 1 x リシスバッファー 25 μ L を添加した。プレートを 15 秒間振盪した後、新しい白色プレートに可溶化液 20 μ L を入れた。ルシフェラーゼアッセイリジェント 100 μ L をさらに添加し、ルミノメーターで発光強度を測定した。また、可溶化液 5 μ L を使用してタンパク定量も行った。

40

【0050】

(f) RAGE アンタゴニスト活性の評価

50

Luciferase Assay System (Promega) を用いて RAGE アンタゴニスト活性の評価を行った：(1日目) Diabetes, 2006, vol. 55, pp. 2510-2522 に記載される方法に従い、pNF- κ B-Luc プラスミド (stratagene 社) とヒト RAGE プラスミド (全長ヒト RAGE cDNA を含む) を導入した C6 グリオーマ細胞を 96 ウェルプレートに 100 μ L / ウェルで播種し、細胞がコンフルエントになるまで CO₂ インキュベーターで培養した。培養には 10% FBS / DMEM 培地を使用した。(2日目) 培地を除去し、無血清 DMEM 培地 300 μ L でウェル内を洗浄後、0.1% FBS / DMEM 培地 100 μ L をゆっくり添加した。その後、CO₂ インキュベーターで一晩培養した。(3日目) 培地を用いて試料を希釈し、各ウェルに希釈した試料 50 μ L、対照としてグリセルアルデヒドで AGE 化された AGE-BSA (50 μ g / mL)、さらに希釈した試料と AGE-BSA の混合液を添加した。CO₂ インキュベーターで 4 時間培養後、培地を除去して PBS (-) 300 μ L でウェル内を 2 回洗浄した。そして氷上で 1 \times リシスバッファ 25 μ L を添加した。プレートを 15 秒間振盪した後、新しい白色プレートに可溶化液 20 μ L を入れた。ルシフェラーゼアッセイリジェント 100 μ L をさらに添加し、ルミノメーターで発光強度を測定した。また、可溶化液 5 μ L を使用してタンパク定量も行った。

【0051】

(3) 結果

糖質としてソルビトールを含有する試験区 3 では、糖質としてグルコースおよびフルクトースを含有する試験区 1 および 2 に比べ、3-DG 生成量が大幅に減少し、かつ、蛍光性 AGEs、ペントシジンおよび CML 生成量も減少していた。また、糖質としてソルビトールを含有する試験区 3 では、糖質としてフルクトースを含有する試験区 2 に比べて RAGE アゴニスト活性が低下し、RAGE アンタゴニスト活性が低下していた。かかる結果から、アミノ酸存在下におけるソルビトールの AGEs および 3-DG 生成抑制効果が認められる。各種 AGEs および 3-DG の定量結果を表 2 に示す。

【0052】

【表 2】

表 2

	3-DG (nmol / 反応液 1 mL)	蛍光性 AGEs (nmol / 反応液 1 mL)	ペントシジン (nmol / 反応液 1 mL)	CML (nmol / 反応液 1 mL)	RAGE アゴニスト 活性※	RAGE アンタゴニ スト活性※
試験区 1 (アミノ酸 + グルコース)	8310	17.4	5.8	1197	0.06	0.56
試験区 2 (アミノ酸 + フルクトース)	904	11.4	24.7	519	0.08	0.70
試験区 3 (アミノ酸 + ソルビトール)	13	0.4	0.8	57	0.07	0.66

※ 対照 (AGE-BSA) の値を 1 として各試料 (RAGE アゴニスト活性) ならびに試料と AGE-BSA の混合液 (RAGE アンタゴニスト活性) の相対値を示した。また、タンパク量 100 μ g / mL の場合の値を示した。

【0053】

試験例 2

(1) 試料の調製

生体蛋白質、糖質およびリン酸緩衝液を表3に示す配合量で50mLのポリプロピレン製遠沈管に入れて密閉し、攪拌した後、37℃で42日間、インキュベーター内で反応させた。次に、反応物を限外濾過ユニット（ピバスピン20、Sartorius社製）を用いて、3000rpmで3時間、遠心分離することにより分画し、低分子画分を3-DG定量用、高分子画分を蛍光性AGEs、ペントシジン、CML、RAGEアゴニスト活性およびRAGEアンタゴニスト活性測定用の試料とした。尚、使用した生体蛋白質および糖質は下記の通りである。

〔生体蛋白質〕

ウシ血清アルブミン（脂肪酸無・低エンドトキシン、シグマアルドリッチジャパン合同会社製）

ヒト血清アルブミン（フラクシオンV、東京化成工業株式会社製）

グロブリン（ウシ血液由来、シグマアルドリッチジャパン合同会社製）

〔糖質〕

グルコース（試薬特級、和光純薬工業株式会社製）

フルクトース（KC特級、片山化学工業株式会社製）

ソルビトール（シグマアルドリッチジャパン特級、シグマアルドリッチジャパン合同会社製）

【0054】

【表3】

表3

	ウシ血清 アルブミン (g)	ヒト血清 アルブミン (g)	γグロブ リン (g)	グルコース (g)	フルクトー ス (g)	ソルビトール (g)	リン酸 緩衝液 (mL)
試験区1	0.4	0	0	1.8	0	0	20
試験区2	0.4	0	0	0	1.8	0	20
試験区3	0.4	0	0	0	0	1.8	20
試験区4	0	0.4	0	1.8	0	0	20
試験区5	0	0.4	0	0	1.8	0	20
試験区6	0	0.4	0	0	0	1.8	20
試験区7	0	0	0.4	1.8	0	0	20
試験区8	0	0	0.4	0	1.8	0	20
試験区9	0	0	0.4	0	0	1.8	20

【0055】

(2) 試験方法

上記のように調製した低分子画分を試料として用いた以外は、試験例1と同様の方法によって3-DGを定量した。高分子画分は0.2μmフィルターで濾過を行い、濾液を試料として用いた以外は、試験例1と同様の方法によって蛍光性AGEs、ペントシジン、CML、RAGEアゴニスト活性およびRAGEアンタゴニスト活性の評価を行った。

【0056】

(3) 結果

上記いずれの生体蛋白質との組合せにおいても、糖質としてソルビトールを含有する試

10

20

30

40

50

試験区 3、6 および 9 では、糖質としてグルコースを含有する試験区 1、4 および 7 に比べて 3 - D G、蛍光性 A G E s、ペントシジンおよび C M L の生成量が減少し、R A G E アゴニスト活性および R A G E アンタゴニスト活性が低下していた。また、糖質としてフルクトースを含有する試験区 2、5 および 8 と比べても、試験区 3、6 および 9 では 3 - D G 生成量が大幅に減少し、蛍光性 A G E s、ペントシジンおよび C M L 生成量も減少し、かつ、R A G E アゴニスト活性が低下していた。試験区 3 および 6 では R A G E アンタゴニスト活性が低下していた。かかる結果から、生体蛋白質存在下におけるソルビトールの各種 A G E s および 3 - D G 生成抑制効果が認められる。各種 A G E s および 3 - D G の定量結果を表 4 に示す。

【 0 0 5 7 】

【表 4】

表 4

	3-DG (nmol /反応液 1 mL)	蛍光性 AGEs (nmol /反応液 1 mL)	ペントシジン (nmol/ 反応液 1 mL)	CML (nmol /反応液 1 mL)	RAGE アゴニスト 活性※	RAGE アンタゴニ スト活性※
試験区 1 (ウシ血清アル ブミン+グルコ ース)	1 0 2 5 3	1 1	0 . 0 1	3 0 9	0 . 3 7	1 . 0 8
試験区 2 (ウシ血清アル ブミン+フルク トース)	5 3 1 6	2 8	0 . 0 3	1 0 4 6	0 . 3 3	1 . 1 5
試験区 3 (ウシ血清アル ブミン+ソルビ トール)	3 3	2 . 0	0 . 0 3	1 0	0 . 2 4	1 . 0 8
試験区 4 (ヒト血清アル ブミン+グルコ ース)	2 5 7 5	8 . 6	0 . 0 2	1 7 4 9	0 . 0 1	1 . 2 0
試験区 5 (ヒト血清アル ブミン+フルク トース)	2 3 5 8	2 5 . 2	0 . 0 5	4 6 2 6	0 . 0 2	1 . 3 3
試験区 6 (ヒト血清アル ブミン+ソルビ トール)	7 8	5 . 4	0 . 0 2	6 9	0 . 0 2	1 . 0 1
試験区 7 (γグロブリン +グルコース)	8 7 7	3 . 0	0 . 0 0 2	3 6 2 8	0 . 0 6	1 . 0 7
試験区 8 (γグロブリン +フルクトース)	8 7 7	1 7 . 3	0 . 0 0 5	3 8 1 3	0 . 0 4	1 . 0 8
試験区 9 (γグロブリン +ソルビトール)	2 1	1 . 3	0 . 0 0 2	2 9	0 . 0 6	0 . 9 0

※ 対照 (AGE-BSA) の値を 1 として各試料 (RAGEアゴニスト活性) ならびに試料と AGE-BSA の混合液 (RAGEアンタゴニスト活性) の相対値を示した。また、各タンパク量がウシ血清アルブミンおよびヒト血清アルブミンについては $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、γグロブリンについては $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の場合の値を示した。

【 0 0 5 8 】

試験例 3

(1) 試料の調製

コラーゲン、糖質およびリン酸緩衝液を表 5 に示す配合量で 50 mL のポリプロピレン製遠沈管に入れて密閉し、攪拌した後、 37°C で 42 日間、インキュベーター内で反応さ

10

20

30

40

50

せた。次に、反応物を限外濾過ユニット（ビバスピン20、Sartorius社製）を用いて、3000rpmで3時間、遠心分離することにより分画し、低分子画分を3-DG定量用試料とした。一方で、アンプル管に高分子画分0.4gおよび6N塩酸8mLを入れ、管内を窒素置換した後、110℃で16時間、ヒートブロックにて加水分解を行った。反応後、5N水酸化ナトリウム8mLを加えた後、pH7.2～7.6の範囲内に納まるよう1N塩酸および1N水酸化ナトリウムを用いてpH調整を行い、0.2μmフィルターで濾過した。得られた濾液を蛍光性AGEs、ペントシジン、CML、RAGEアゴニスト活性およびRAGEアンタゴニスト活性測定用試料とした。尚、使用したコラーゲンおよび糖質は下記の通りである。

10

〔生体蛋白質〕

コラーゲン（コラーゲンタイプIウシ真皮由来、ペプシン可溶化、株式会社ニッピ）

〔糖質〕

グルコース（試薬特級、和光純薬工業株式会社製）

フルクトース（KC特級、片山化学工業株式会社製）

ソルビトール（シグマアルドリッチジャパン特級、シグマアルドリッチジャパン合同会社製）

【0059】

【表5】

20

表5

	コラーゲン (g)	グルコース (g)	フルクトース (g)	ソルビトール (g)	リン酸緩衝液 (mL)
試験区1	0.015	1.8	0	0	20
試験区2	0.015	0	1.8	0	20
試験区3	0.015	0	0	1.8	20

*表中のコラーゲン量は、3mg/mLコラーゲンを5mL使用した場合の蛋白質量として表した。

30

【0060】

（2）試験方法

上記のように調製した低分子画分を試料として用いた以外は、試験例1と同様の方法によって3-DGを定量した。また、上記のように調製した高分子画分濾液を試料として用いた以外は、試験例1と同様の方法によって蛍光性AGEs、ペントシジン、CML、RAGEアゴニスト活性およびRAGEアンタゴニスト活性の評価を行った。

【0061】

（3）結果

40

糖質としてソルビトールを含有する試験区3では、糖質としてグルコースおよびフルクトースを含有する試験区1および2よりも3-DG生成量が大幅に減少し、蛍光性AGEs、ペントシジンおよびCML生成量が減少し、RAGEアゴニスト活性およびRAGEアンタゴニスト活性が低下していた。各種AGEsおよび3-DGの定量結果を表6に示す。

【0062】

【表 6】

表 6

	3-DG (nmol /反応液 1 mL)	蛍光性 AGEs (nmol /反応液 1 mL)	ペントシジン (nmol/ 反応液 1 mL)	CML (nmol /反応液 1 mL)	RAGE アゴニスト 活性※	RAGEア ンタゴニス ト活性※
試験区 1 (コラーゲン +グルコース)	232	1.4	0.06	475	0.45	2.85
試験区 2 (コラーゲン +フルクトース)	1447	2.4	0.15	452	0.58	2.49
試験区 3 (コラーゲン +ソルビトール)	24	0.5	0.05	445	0.27	1.22

※ 対照 (AGE-BSA) の値を 1 とし、各試料 (RAGEアゴニスト活性) ならびに試料と AGE-BSA の混合液 (RAGEアンタゴニスト活性) の相対値を示した。また、タンパク量 10 μ g/mL の場合の値を示した。

【0063】

処方例 1 (散剤)

表 7 に示す原材料を混合し、散剤を製造した。該散剤は、本発明の AGEs 生成抑制剤もしくは 3-DG 生成抑制剤、または本発明の糖尿病予防 / 治療用医薬組成物の一形態である。

【表 7】

表 7 (散剤の処方)

原材料	処方
ソルビトール	90 g
乳糖	10 g

【0064】

処方例 2 (錠剤)

表 8 に示す原材料を混合した後、連続式打錠機 (Piccola B-10 / RIVA 社製) を用い、杵金型 (8 mm、R12 mm)、1 錠あたりの重量 150 ~ 200 mg、回転盤の回転数 12 rpm、打錠圧 4 kN の打錠条件で直接打錠し、錠剤を製造した。該錠剤は、本発明の AGEs 生成抑制剤もしくは 3-DG 生成抑制剤、または本発明の糖尿病予防 / 治療用医薬組成物の一形態である。

【表 8】

表 8 (錠剤の処方)

原材料	処方
ソルビトール	94 g
デキストリン	5 g
ステアリン酸カルシウム	1 g

【0065】

処方例 3 (経口液剤)

表 9 に示す原材料を蒸留水 5 0 0 m L に溶解し、経口液剤を製造した。該経口液剤は、本発明の糖尿病予防 / 治療用医薬組成物の一形態である。

【表 9】

表 9 (経口液剤の処方)

原材料	処方
クエン酸	0 . 3 g
ビタミン B 1 (チアミン塩酸塩)	0 . 0 5 g
ビタミン C (L - アスコルビン酸)	0 . 0 6 g
塩化ナトリウム	0 . 1 g
異性化糖	1 0 g
ソルビトール	8 g

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 9/48 (2006.01) A 6 1 K 9/48
A 2 3 L 33/125 (2016.01) A 2 3 L 33/125

(72)発明者 本多 純哉
大阪府大阪市中央区高麗橋2丁目4番8号 上野製薬株式会社内
(72)発明者 川浦 亮介
大阪府大阪市中央区高麗橋2丁目4番8号 上野製薬株式会社内
(72)発明者 樽谷 彩
大阪府大阪市中央区高麗橋2丁目4番8号 上野製薬株式会社内

審査官 鳥居 福代

(56)参考文献 特開2004-049093(JP,A)
特開2014-129321(JP,A)
特表2009-501700(JP,A)
特表平07-500580(JP,A)
特表2007-525418(JP,A)
特開平10-182460(JP,A)
調理科学, 1985年, Vol.18, No.2, p.87-93
月刊フードケミカル, 2009年, 第25巻, 第11号, p.19-21

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 31/00-33/327
A 6 1 K 9/00-9/72
A 2 3 L 33/10
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)