

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年2月7日 (07.02.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/015950 A1

- (51) 国際特許分類:
C07D 493/04 (2006.01) A61K 36/23 (2006.01)
A23K 1/16 (2006.01) A61P 3/06 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
A61K 31/37 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/064634
- (22) 国際出願日: 2007年7月26日 (26.07.2007)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2006-211310 2006年8月2日 (02.08.2006) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): タカラバイオ株式会社 (TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 Shiga (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 榎竜嗣 (ENOKI, Tatsuji). 高島扶有子 (TAKASHIMA, Fuyuko). 大野木宏 (OHNOGI, Hiromu). 加藤郁之進 (KATO, Ikunoshin).
- (74) 代理人: 細田 芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒5406591 大阪府大阪市中央区大手前一丁目7番31号 OMMビル5階 私書箱26号 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書

(54) Title: ACAT INHIBITOR

(54) 発明の名称: A C A T 阻害剤

(57) Abstract: An acyl-CoA cholesterol acyltransferase inhibitor comprising at least one member selected from the group consisting of 3'-acetoxy-4'-tigloyloxy-3'-4'-dihydroselelin, a derivative thereof and a pharmaceutically acceptable salt of the compound or the derivative as an active ingredient. The inhibitor or a pharmaceutical, food or animal feed comprising the inhibitor is effective for hyperlipemia, arterial sclerosis or a disease associated with these diseases. Particularly, the food is useful as a functional food which has an inhibitory activity on acyl-CoA cholesterol acyltransferase and is effective for the maintenance of homeostasis *in vivo*.

(57) 要約: 3'-アセトキシ-4'-チグロイルオキシ-3', 4'-ジヒドロセセリン、その誘導体及び薬学的に許容されるそれらの塩からなる群より選ばれた一種以上を有効成分として含有することを特徴とする、アシルCoAコレステロールアシルトランスフェラーゼ阻害剤。本発明の阻害剤、医薬、食品又は飼料は、高脂血症、動脈硬化、それらに起因する疾患に対して有用であり、なかでも、本発明の食品はアシルCoAコレステロールアシルトランスフェラーゼ阻害作用を有する生体の恒常性の維持に有用な機能性食品として有用である。



WO 2008/015950 A1

明 細 書

ACAT阻害剤

技術分野

[0001] 本発明は、アシルCoAコレステロールアシルトランスフェラーゼ阻害作用を有する動脈硬化症、高脂血症等の治療又は予防に有用な天然物由来の成分に関する。

背景技術

[0002] 近年、高カロリー・高コレステロール食を多く摂取する食生活の変化や、平均寿命の伸びによる高年齢層の増加に伴って、動脈硬化症、高脂血症、高血圧症、糖尿病といったいわゆる生活習慣病の増加が急増しており、大きな社会問題となってきている。

[0003] 動脈硬化症の初期病変には脂肪線条と呼ばれる斑点状もしくは線状の脂肪沈着が見られる。この変化は主に泡沫化されたマクロファージが血管内皮に集積することによるものである。マクロファージの泡沫化は、マクロファージが変性LDLを取り込んで遊離コレステロールを生成し、アシルCoAコレステロールアシルトランスフェラーゼによってエステル化され、これが蓄積することにより起こる。このような初期の泡沫化細胞病変は血管平滑筋細胞の泡沫化を含む複雑な病変に進行する。脂肪線条はやがて線維性硬斑となって血管壁に突出し、さらに病変が進むと石灰化、血栓の付着を伴って、血管腔を狭めたり、硬斑が破綻して血栓性閉塞をきたす。また、破綻しやすい硬斑はコレステロールエステル等の脂質成分を多く含むことも知られている。従って、アシルCoAコレステロールアシルトランスフェラーゼの活性を阻害することにより、動脈硬化病変の安定化と退縮をもたらし、動脈硬化や高脂血症に基づく急性冠症候群の発症や再発の低減につながることが期待される。また、アシルCoAコレステロールアシルトランスフェラーゼ活性を阻害することにより、肝臓においてVLDLの構成をなすコレステロールエステルの合成低下がおこりVLDL合成が減少したり、小腸においてコレステロールのエステル結合を阻害しコレステロールの吸収が低下することが知られていることから、血中コレステロール、血中中性脂肪を減少させることが期待できる。

[0004] ボタンボウフウは、学名 *Peucedanum japonicum* というセリ科カワラボウフウ属に属する多年草で、海岸の岩場や草地に生え、茎は高さが30～100cmで、花期の6～9月になると小さい白色の花を多数つける。その生理活性については、原産地である沖縄では感冒、疲労回復、滋養強壮に効果があると言われ、昔から重宝されてきた。最近の研究では、ボタンボウフウにはがん抑制効果(例えば、非特許文献1)、二糖類分解酵素阻害作用(例えば、特許文献1)、抗酸化作用(例えば、特許文献2、非特許文献2)、細胞賦活作用(例えば、特許文献2)、メラニン産生抑制作用(例えば、特許文献2)があることも知られている。

[0005] ボタンボウフウに含まれる特徴的な化学成分としては、複数種のクマリン誘導体が知られており、その発がんプロモーター抑制作用等についての検討がなされている(例えば、非特許文献3)。

特許文献1:特開2003-26694号公報

特許文献2:特開2004-26697号公報

非特許文献1:T. Morioka 他8名, *Cancer Letters*, 2004年, Vol. 205, p133-141

非特許文献2:M. Hisamoto 他2名, *J. Agric. Food Chem.*, 2004年, Vol. 52, p445-450

非特許文献3:B. Fan 他5名, *Journal of Japanese Botany*, 2000年, Vol. 75, No. 4, p257-261

発明の要約

[0006] 本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、3'-アセトキシ-4'-チグロイルオキシ-3', 4'-ジハイドロセセリン、その誘導体及び薬学的に許容されるそれらの塩からなる群より選ばれる一種以上を有効成分として含有することを特徴とする、アシルCoAコレステロールアシルトランスフェラーゼ阻害剤に関する。

[0007] 本発明の第2の発明は、本発明の第1の発明のアシルCoAコレステロールアシルトランスフェラーゼ阻害剤を含有することを特徴とする医薬に関する。

[0008] 本発明の第3の発明は、本発明の第1の発明のアシルCoAコレステロールアシルトランスフェラーゼ阻害剤を含有することを特徴とする食品又は飲料に関する。

発明の詳細な説明

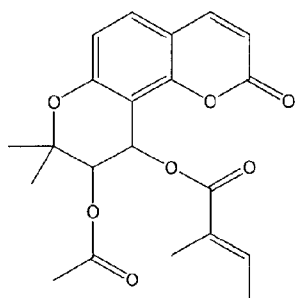
[0009] 本発明は、安全で、簡便に摂取可能な、食品素材、医薬品素材として適したアシルCoAコレステロールアシルトランスフェラーゼ阻害作用を有する物質を利用した医薬、食品又は飼料に関する。

[0010] 本発明により、天然物由来成分である3'-アセトキシ-4'-チグロイルオキシ-3', 4'-ジヒドロセセリン、その誘導体及び薬学的に許容されるそれらの塩からなる群より選ばれる一種以上を有効成分として含有するアシルCoAコレステロールアシルトランスフェラーゼ阻害剤、該阻害剤を含有する医薬、食品又は飼料が提供される。前記阻害剤、医薬、食品又は飼料は、高脂血症、動脈硬化、それらに起因する疾患に対して有用であり、なかでも本発明の食品はアシルCoAコレステロールアシルトランスフェラーゼ阻害作用を有する生体の恒常性の維持に有用な機能性食品として有用である。

[0011] アシルCoAコレステロールアシルトランスフェラーゼ(別名、アシルCoA:コレステロールO-アシルトランスフェラーゼとも称する。以下、ACATと略称することがある)は、コレステロールにアシルCoAから長鎖脂肪酸を転移し、コレステロールエステル合成を触媒する酵素である。ACAT阻害作用は、後述の実施例1に記載のようなアッセイ系を用いて簡便に測定することができる。すなわち、被験物質とACATを含む酵素源とを混合し、放射ラベルされたOleoyl-CoAからコレステロールへのOleoyl基の転移を評価することで、ACAT阻害作用を簡便に測定することができる。

[0012] 下記式(I)に3'-アセトキシ-4'-チグロイルオキシ-3', 4'-ジヒドロセセリン(以下、本発明の化合物と称することがある)の構造式を示す。

[0013] [化1]



(I)

- [0014] 当該化合物はボタンボウフウや前胡 (*Peucedanum praeruptorum*) に含まれる物質であり、本発明においてACAT阻害作用を有することが初めて明らかにされた。すなわち、本発明における有効成分としては、3'-アセトキシ-4'-チグロイルオキシ-3', 4'-ジハイドロセセリン、その誘導体及び／又は薬学的に許容されるそれらの塩(以下、これら全てを本発明の有効成分と称することがある)が使用される。
- [0015] 本発明の化合物の製造方法としては、特に限定はないが、ボタンボウフウや前胡 (*Peucedanum praeruptorum*) を原料として用いることができ、例えば調製例1に記載のとおりボタンボウフウのエタノール抽出物から各種クロマトグラフィーを行って得ることができる。なお、原料としてボタンボウフウを使用する場合、特に限定はないが、果実、種子、種皮、花、葉、茎、根、根茎及び／又は植物全体そのままを使用することができるが、好適には葉及び／又は茎を使用することができる。また、本発明の化合物を合成する場合は公知の方法を組み合わせることにより得ることもできる。
- [0016] なお、本明細書において3'-アセトキシ-4'-チグロイルオキシ-3', 4'-ジハイドロセセリンとは、いかなる光学異性体、ケト-エノール互変異性体、幾何異性体などの各種異性体であっても、ACAT阻害作用を有する限り、全て本発明において使用することができる。
- [0017] 本願明細書において誘導体としては、例えば上記の3'-アセトキシ-4'-チグロイルオキシ-3', 4'-ジハイドロセセリンの骨格に種々の置換基が結合し、所望の効果を発揮しうるものであれば特に限定はない。置換基としては、例えば、脂肪族基(メチル基、エチル基、n-プロピル基などの直鎖状脂肪族基やイソプロピル基、イソブチル基、プレニル基、ゲラニル基などの分枝状脂肪族基)、芳香族基(フェニル基、ナフチル基、ビフェニル基、ピロリル基、インドリル基など)、芳香脂肪族基(ベンジル基、フェネチル基など)、水酸基、カルボキシル基、硫酸基、燐酸基、チオール基、アミノ基、ニトロ基、アルコキシ基(メトキシ基など)、アシルオキシ基(アセチル基など)、ハロゲン(塩素、臭素、フッ素など)を挙げることができる。また、例えば、本発明の化合物を哺乳類に投与して代謝されてできた物質も本発明の誘導体に包含される。
- [0018] 本発明に使用される3'-アセトキシ-4'-チグロイルオキシ-3', 4'-ジハイドロセセリン又はその誘導体の塩としては薬学的に許容される塩が好ましい。本発明で

使用される塩としては、例えば、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、有機塩基との塩などが例示される。なお、本発明において使用される薬学的に許容される塩とは生物に対して実質的に無毒であって、かつACAT阻害作用を有する化合物の塩を意味する。当該塩としては、例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウム又はプロトン化されたベンザチン(N, N'-ジベンジルエチレンジアミン)、コリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、メグラミン(N-メチルグルカミン)、ベネタミン(N-ベンジルフェネチルアミン)、ピペラジンもしくはトロメタミン(2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3-プロパンジオール)の塩が挙げられる。

[0019] 本発明の化合物の誘導体は、当該分野で公知の方法により、作製され得る。また、本発明の化合物又は誘導体の塩も、当該分野で公知の任意の方法により、当業者によって容易に作製され得る。

[0020] 本発明の有効成分は、古来より食用とされてきたボタンボウフウに含有される化合物であり、これまでに知られているACAT阻害作用を有する合成化合物(例えば、後述のFR179254)と比較しても安全性が高く、後述するように特に毒性は認められず、副作用の発生の心配もない。それゆえ、安全かつ適切に疾患の治療又は予防を行うことができる。従って、当該有効成分を含んでなるACAT阻害剤(以下、本発明のACAT阻害剤と称することがある)は、ACAT阻害作用を要する疾患の治療又は予防に有効であり、後述する医薬、食品又は飼料の素材として有用である。また、本発明のACAT阻害剤は、治療又は予防にACAT阻害作用を要する疾患、例えば、動脈硬化症や高脂血症、これらが原因因子となって起こる疾患に対する薬物のスクリーニングにも有用である。さらに当該ACAT阻害剤は、コレステロールエステル生成のメカニズム研究や、それによる高脂血症、動脈硬化症等前述の疾患への進展に関わるメカニズム研究にも有用である。

[0021] 本発明のACAT阻害剤としては、前述の本発明の有効成分を含むものであれば特に限定はないが、例えば、本発明の有効成分そのもの、もしくは本発明の有効成分を含む組成物であっても良い。すなわち、当該ACAT阻害剤における前記有効成分の含有量は、当該ACAT阻害剤の使用目的などを考慮し、本発明の所望の効

果の発現が得られ得るような量であればよく、特に限定されるものではない。本発明のACAT阻害剤中の有効成分の含有量としては通常1～100重量%程度である。また、当該ACAT阻害剤の使用量も、本発明の所望の効果の発現が得られ得る量であれば特に限定されるものではなく、生体に投与して使用する場合には、好ましくは後述の本発明の医薬における有効成分の投与量の範囲内で有効成分を投与できるような量で使用すればよい。投与方法についても特に限定されるものではなく、後述の医薬と同様に適宜設定すればよい。また、使用形態についても、特に限定されるものではなく、使用される用途に応じて適当な形態に製造することもできる。

[0022] また、本発明は、本発明のACAT阻害剤を含有する医薬(以下、本発明の医薬と称することがある)も提供する。本発明の医薬は、治療又は予防にACAT阻害作用を要する疾患に対して有用であり、当該疾患としては特に限定はないが、例えば、高脂血症、高コレステロール血症、高トリグリセライド血症、メタボリック症候群、マルチプルリスクファクター症候群、動脈硬化症、虚血性心疾患、急性心筋梗塞、不安定狭心症、虚血性突然死、脳血管障害、慢性閉塞性動脈硬化症、心筋梗塞、狭心症、脳梗塞、くも膜下出血、肥満症又はこれらが原因因子となって起こる疾患が例示される(例えば、O'Rourkeら, J. Biol. Chem., 2002, 277(45), 42557-42562、Ohishiら, Biol. Pharm. Bull., 2003, 26(8), 1125-1128、及びOhishiら, Chem. Pharm. Bull., 2001, 49(7), 830-839参照)。

[0023] 本発明の医薬としては、本発明に係るACAT阻害剤として使用される前記有効成分を公知の医薬用担体と組み合わせて製剤化したものが挙げられる。また、本発明の医薬としては、本発明の有効成分を、前述するような当該有効成分と同じ用途に使用可能な他の成分と配合することもできる。

[0024] 本発明の医薬の製造は、通常、前記有効成分を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合することにより行われ、所望により溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。また、使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品や、その他、外用剤とすることもできる。

- [0025] 医薬用担体は、医薬の投与形態及び製剤形態に応じて選択することができる。固体組成物からなる経口剤とする場合は、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、細粒剤、顆粒剤等とすることができ、例えば、デンプン、乳糖、白糖、マンニト、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩などの医薬用担体が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料などを配合することもできる。例えば、錠剤又は丸剤とする場合は、所望によりショ糖、ゼラチン、ハイドロキシプロピルセルロースなどの糖衣又は胃溶性もしくは腸溶性物質のフィルムで被覆してもよい。液体組成物からなる経口剤とする場合は、薬学的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤などとすることができ、例えば、精製水、エタノールなどが担体として利用される。また、さらに所望により湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、防腐剤などを添加してもよい。
- [0026] 一方、非経口剤とする場合は、常法に従い本発明の前記有効成分を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、落花生油、大豆油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどに溶解しないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤などを加えることにより調製することができる。また、固体組成物を製造し、使用前に無菌水又は無菌の注射用溶媒に溶解して使用することもできる。
- [0027] 外用剤としては、経皮投与用又は経粘膜(口腔内、鼻腔内)投与用の、固体、半固体状又は液状の製剤が含まれる。また、座剤なども含まれる。例えば、乳剤、ローション剤などの乳濁剤、外用チンキ剤、経粘膜投与用液剤などの液状製剤、油性軟膏、親水性軟膏などの軟膏剤、フィルム剤、テープ剤、パップ剤などの経皮投与用又は経粘膜投与用の貼付剤などとすることができる。
- [0028] 上記のような各種製剤形態での医薬は、それぞれ公知の医薬用担体などを利用して、適宜、常法により製造することができる。また、かかる医薬における有効成分の含有量は、その投与形態、投与方法などを考慮し、好ましくは後述の投与量範囲で当該有効成分を投与できるような量であれば特に限定されるものではない。本発明の医薬中の有効成分の含有量としては通常1～100重量%程度である。

[0029] 本発明の医薬は、製剤形態に応じた適当な投与方法で投与される。投与方法も特に限定はなく、例えば内用、外用及び注射により投与することができる。本発明の医薬を注射により投与する場合は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内などに投与し得、外用により投与する場合は、例えば、座剤等の外用剤として、その適する投与方法により投与すればよい。

[0030] 本発明の医薬の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及び当該医薬の投与対象である患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され一定ではない。一般には、製剤中に含有される前記有効成分の投与量で、成人1日当り好ましくは0.1 μg ～5g/kg体重、より好ましくは1 μg ～2g/kg体重、さらに好ましくは10 μg ～1g/kg体重である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。投与は、所望の投与量範囲内において、1日内において単回で、又は数回に分けて行ってもよい。投与期間も任意である。また、本発明の医薬はそのまま経口投与するほか、任意の食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

[0031] 本発明の別の態様として、前記医薬を用いた疾患の治療方法が提供される。当該疾患の治療方法は、前述の本発明の有効成分を含有する医薬を、高脂血症、高コレステロール血症、高トリグリセライド血症、メタボリック症候群、マルチプルリスクファクター症候群、動脈硬化症、虚血性心疾患、急性心筋梗塞、不安定狭心症、虚血性突然死、脳血管障害、慢性閉塞性動脈硬化症、心筋梗塞、狭心症、脳梗塞、くも膜下出血、肥満症又はこれらが原因因子となって起こる疾患の患者に投与することを特徴とする。なお、当該医薬の投与の諸条件については、前述の医薬の投与の開示に従って実施できる。

[0032] また、本発明の別の態様として、前記医薬を製造するための3'-アセトキシ-4'-チグロイルオキシ-3', 4'-ジハイドロセセリンの使用が提供される。なお、3'-アセトキシ-4'-チグロイルオキシ-3', 4'-ジハイドロセセリンとしては、前述の誘導体、薬学的に許容されるそれらの塩が含まれる。

[0033] 本発明は、前記本発明のACAT阻害剤を含有してなるACAT阻害用の食品又は飼料(本明細書中において、本発明の食品又は飼料と称することがある)を提供する

。本発明の食品又は飼料は、本発明の有効成分の有するACAT阻害作用により、治療又は予防にACAT阻害作用を要する疾患、すなわち本発明の医薬が適用可能な前述する各種疾患の症状改善、予防に極めて有用である。すなわち、本発明の食品は上記の疾患の予防、改善又は治療を目的とすることを付した機能性食品(特定保健用食品等)として極めて有用であり、血中コレステロール値が気になる方、中性脂肪が気になる方、体脂肪が気になる方にとって極めて有用な食品となる。なお、本願明細書において、食品とは飲料をも包含するものである。

[0034] なお、本発明の食品又は飼料において「含有」とは、含有、添加及び／又は希釈を意味する。ここで、「含有」とは食品又は飼料中に本発明で使用する有効成分が含まれるという態様を、「添加」とは食品又は飼料の原料に、本発明で使用する有効成分を添加するという態様を、「希釈」とは本発明で使用する有効成分に、食品又は飼料の原料を添加するという態様をいうものである。

[0035] 本発明の食品としては特に限定はないが、例えば、本発明に係る前記有効成分が含有されてなる、穀物加工品(小麦粉加工品、デンプン類加工品、プレミックス加工品、麺類、マカロニ類、パン類、あん類、そば類、麩、ビーフン、はるさめ、包装餅など)、油脂加工品(可塑性油脂、てんぷら油、サラダ油、マヨネーズ類、ドレッシングなど)、大豆加工品(豆腐類、味噌、納豆など)、食肉加工品(ハム、ベーコン、プレスハム、ソーセージなど)、水産製品(冷凍すりみ、かまぼこ、ちくわ、はんぺん、さつま揚げ、つみれ、すじ、魚肉ハム、ソーセージ、かつお節、魚卵加工品、水産缶詰、つくだ煮など)、乳製品(原料乳、クリーム、ヨーグルト、バター、チーズ、練乳、粉乳、アイスクリームなど)、野菜・果実加工品(ペースト類、ジャム類、漬け物類、果実飲料、野菜飲料、ミックス飲料など)、菓子類(チョコレート、ビスケット類、菓子パン類、ケーキ、餅菓子、米菓類など)、アルコール飲料(日本酒、中国酒、ワイン、ウイスキー、焼酎、ウォッカ、ブランデー、ジン、ラム酒、ビール、清涼アルコール飲料、果実酒、リキュールなど)、嗜好飲料(緑茶、紅茶、ウーロン茶、コーヒー、清涼飲料、乳酸飲料など)、調味料(しょうゆ、ソース、酢、みりんなど)、缶詰・瓶詰め・袋詰め食品(牛飯、釜飯、赤飯、カレー、その他の各種調理済み食品など)、半乾燥又は濃縮食品(レバーペースト、その他のスプレッド、そば・うどんの汁、濃縮スープ類など)、乾燥食品(即席麺類

、即席カレー、インスタントコーヒー、粉末ジュース、粉末スープ、即席味噌汁、調理済み食品、調理済み飲料、調理済みスープなど）、冷凍食品（すき焼き、茶碗蒸し、うなぎかば焼き、ハンバーグステーキ、シュウマイ、餃子、各種スティック、フルーツカクテルなど）、固形食品、液体食品（スープなど）、香辛料類などの農産・林産加工品、畜産加工品、水産加工品などが挙げられる。

[0036] 本発明の食品は、前記有効成分が単独もしくは複数、含有、添加及び／又は希釈されており、その含有量がACAT阻害作用を発現するための必要量に相当するものであれば、特にその形状に限定はなく、粉末状、タブレット状、顆粒状、カプセル状等の経口的に摂取可能な形状物も包含する。また、本発明の食品としては、前述する本発明の有効成分をそのまま、もしくは適当な乳化剤や賦形剤等と適宜混合したものも包含される。これらの食品はそのまま、もしくは水と混合して飲料として食することができる。

[0037] また、本発明の食品については、本発明の有効成分と各種植物（野菜や果実等）の搾汁液と混合して健康飲料とすることもできる。例えば、本発明の有効成分を水で希釈したり、ボタンボウフウ、前胡（*Peucedanum praeruptorum*）、アシタバ、パセリ、セロリ、甘草、ニンジン、小松菜、カブ、チンゲンサイ、トマト、ミカン、レモン、グレープフルーツ、キウイ、ほうれん草、ラディッシュ、大根、白菜、キャベツ、サラダ菜、レタス、ニラ、オクラ、ピーマン、キュウリ、インゲン、えだまめ、エンドウ、トウモロコシ、ニンニク、ルッコラ、ビワ、夏みかん、甘夏等の搾汁液や、牛乳、豆乳等と混合してACAT阻害作用を有する健康飲料とすることができる。

[0038] また、本発明の食品の態様としては、3'-アセトキシ-4'-チグロイルオキシ-3', 4'-ジハイドロセセリンを有効成分（関与成分）として、それを含有する植物の処理物、例えばボタンボウフウの抽出物や粉碎物、搾汁液等を、そのまま本発明の有効成分の効果を期待した食品、例えば特定保健用食品とする態様も包含される。

[0039] 本発明の食品中の前記有効成分の含有量は特に限定されず、その官能と活性発現の観点から適宜選択できるが、例えば食品中の本発明の有効成分が、好ましくは0.00001重量%以上、より好ましくは0.0001～10重量%、さらに好ましくは0.0006～6重量%である。

- [0040] 本発明の食品の製造方法に特に限定はない。例えば、配合、調理、加工などは一般の食品のものに従えばよく、それらの製造方法により製造することができ、得られた食品にACAT阻害作用を有する本発明に係る前記有効成分が含有されていれば良い。
- [0041] 本発明の食品は、例えば本発明の有効成分を、成人1日当り好ましくは $0.1 \mu\text{g} \sim 5\text{g/kg}$ 体重、より好ましくは $1 \mu\text{g} \sim 2\text{g/kg}$ 体重、さらに好ましくは $10 \mu\text{g} \sim 1\text{g/kg}$ 体重となるように摂取すればよい。
- [0042] また、本発明は、前記有効成分を含有、すなわち、含有、添加及び／又は希釈してなる、ACAT阻害作用を有する生物用の飼料を提供するものであり、さらに、別の一態様として、前記有効成分を生物に投与することを特徴とする生物の飼育方法をも提供する。また、本発明の別の一態様として、前記有効成分を含有することを特徴とする生物飼育用剤が提供される。
- [0043] 本明細書において、生物としては、限定はないが、例えば養殖動物、ペット動物などが挙げられる。養殖動物としてはウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、ラマなどの家畜、マウス、ラット、モルモット、ウサギなどの実験動物、ニワトリ、アヒル、七面鳥、駝鳥などの家禽、魚類、甲殻類又は貝類が例示される。ペット動物としてはイヌ、ネコなどが例示される。飼料としては体調の維持及び／又は改善用飼料が例示される。生物飼育用剤としては浸漬用剤、飼料添加剤、飲料用添加剤が例示される。
- [0044] これらの発明によれば、それらを適用する前記例示するような生物において、本発明に使用される前記有効成分のACAT阻害作用に基づき、本発明の前記医薬によるのと同様の効果の発現が期待できる。すなわち、本発明の飼料は、当該生物における治療又は予防にACAT阻害作用を要する疾患、例えば動脈硬化症や高脂血症、これらが原因因子となって起こる疾患の治療又は予防効果を発揮し得る。
- [0045] 本発明に使用される前記有効成分は通常、対象生物1日当り好ましくは $0.1 \mu\text{g} \sim 5\text{g/kg}$ 体重、より好ましくは $1 \mu\text{g} \sim 2\text{g/kg}$ 体重、さらに好ましくは $10 \mu\text{g} \sim 1\text{g/kg}$ 体重となるように投与される。投与は、例えば、当該有効成分を、対象生物に供する人工配合飼料の原料中に添加混合しておくか、人工配合飼料の粉末原料と混合した後、その他の原料にさらに添加混合することで行うことができる。また、前記有効成

分の飼料中の含有量は特に限定されるものではなく、目的に応じて適宜設定すれば良いが、例えば、好ましくは0.00001重量%以上、より好ましくは0.0001～10重量%、さらに好ましくは0.0006～6重量%である。生物飼育用剤における本発明の有効成分の含有量も同程度とすればよい。

[0046] 本発明の飼料の製造方法に特に限定はなく、また配合も一般の飼料に準ずるものであればよく、製造された飼料中にACAT阻害作用を有する本発明に係る前記有効成分が含まれていればよい。生物飼育用剤も同様にして調製することができる。

[0047] 本発明においては、例えば、ACAT阻害作用を有する本発明に使用される前記有効成分を含んでなる飼料を摂取させたり、又は本発明に使用される前記有効成分の含有液(例えば、前記浸漬用剤を水に溶解させたもの)に対象生物を浸漬したりすることにより、家畜、実験動物、家禽、ペット動物などの体調を良好に維持し、又は、改善させたりすることができる。なお、これらの態様は本発明における生物の飼育方法の一態様である。

[0048] 本発明で使用される前記有効成分は、その作用発現にとっての有効量の投与を生体に行っても毒性は認められない。例えば経口投与の場合、3'-アセトキシ-4'-チグロイルオキシ-3', 4'-ジハイドロセセリンを1g/kg体重でマウスに単回投与しても死亡例は認められない。また、前記有効成分は、ラットへの経口投与において1g/kg体重を経口単回投与しても死亡例は認められない。

実施例

[0049] 以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの記載に何ら限定されるものではない。なお、実施例における「%」は特に記載がなければすべて「容量%」を意味する。

[0050] 調製例1 3'-アセトキシ-4'-チグロイルオキシ-3', 4'-ジハイドロセセリンの調製

(1) ボタンボウフウ葉茎部の凍結乾燥物を粉碎したもの100gに、2Lの60%エタノールを加え、30分間程度、室温で時々攪拌しながら抽出を行い、吸引ろ過にて抽出液と残渣に分けた。次いで、残渣に対して同溶媒2Lによる抽出操作を繰り返した。得られた抽出液を集めてロータリーエバポレーターで濃縮後、糖を除くために40%

エタノール抽出を何度か行い、得られた抽出画分を再度濃縮した。最終的に50mLの20%エタノールに溶解し、ボタンボウフウ60%エタノール抽出物を得た。

- [0051] (2) 調製例1-(1)で得られたボタンボウフウ60%エタノール抽出物を逆相クロマトグラフィーを用いて分画した。樹脂は20%エタノールで平衡化したコスモシール75 C18-OPN(200mL、ナカライテスク社製)を用いた。ボタンボウフウ60%エタノール抽出物を樹脂に添加後、800mLの20%エタノール、3.4Lの40%エタノール、1.6Lの60%エタノール、1Lの80%エタノールの順に溶出を行った。
- [0052] (3) 調製例1-(2)で得られた40%エタノール溶出液のうち1.6Lから2Lの画分および2Lから2.4Lの画分をロータリーエバポレーターで濃縮した。それぞれ最終的に5mLの40%エタノールに溶解し、ボタンボウフウコスモシール分画画分-1、ボタンボウフウコスモシール分画画分-2とした。
- [0053] (4) 調製例1-(3)で得られたボタンボウフウコスモシール分画画分-1およびボタンボウフウコスモシール分画画分-2を逆相クロマトグラフィーを用いて分画した。カラムはTSK gel ODS-80Ts(20mm×25cm、東ソー社製)を用いた。溶媒は蒸留水:アセトニトリル=30:70(容量比)、溶出速度は5mL/分、検出はUV:215nmで行った。溶出液の紫外線吸収を指標に溶出液を分画した。
- [0054] (5) 調製例1-(4)で得られた保持時間33.3分のピークを含む画分をロータリーエバポレーターで濃縮した。最終的に10mLのジメチルスルホキシドに溶解し、ボタンボウフウ逆相カラム分画画分を得た。
- [0055] (6) 調製例1-(5)で得られたボタンボウフウ逆相カラム分画画分を核磁気共鳴(NMR)スペクトル装置(AVANCE600型、ブルカー・バイオスピン社製)を用い、各種NMRスペクトルを測定した。また、質量スペクトルを質量分析計(API3000、Applied Biosystems社製)によりイオンスプレー法で測定した。NMRスペクトル、質量スペクトル解析の結果、ボタンボウフウ逆相カラム分画画分は上記式(I)に示す3'-アセトキシ-4'-チグロイルオキシ-3', 4'-ジハイドロセセリン(3'-Acetoxy-4'-tigloyloxy-3', 4'-dihydroseselin)であることが確定した。

[0056] 実施例1

(1) ラットマイクロソームの調製

Sprague-Dawleyラット4匹を1週間飼育後、屠殺し、直ちに肝臓を摘出し冷食塩水で軽く洗浄後、スクロースバッファー(0.3M スクロース、50mM トリス-HCl、1mM EDTA、50mM NaCl、pH7.4)に浸漬(25mL/1匹)した。得られた肝臓をホモジナイズし、10,000×g、30分間遠心を行い沈殿を除去する操作を2回繰り返した。得られた上清を105,000×g、70分間遠心を行い沈殿を回収し、適当量の100mM リン酸バッファー(pH7.4)に懸濁した。タンパク濃度が10mg/mLになるように再度リン酸バッファーに懸濁し、終濃度1mMになるようにEDTAを添加後、使用するまで-80°Cで凍結保存した。

[0057] (2) ACAT阻害活性の測定

ACATの酵素活性はLeeらの方法(Planta Med., 2004, 70, p678-679)に従って、一部改良して測定した。

[0058] 1. 5mLエッペンドルフチューブ中において実施例1-(1)で調製したラット肝ミクロソーム1.5μLを含む反応水溶液(0.05M リン酸カリウム、1mM ジチオスレイトール、9mg/mL 脂肪酸フリーウシ血清アルブミン、200μg/mL コレステロール、pH7.4)92μLに終濃度14μg/mLとなるように調製例1で調製した3'-アセトキシ-4'-チグロイルオキシ-3',4'-ジヒドロセセリンジメチルスルホキシド溶液1μLを添加し37°Cで30分保温した。また、対照区分として化合物を添加せずジメチルスルホキシド溶液のみを添加した区分、陽性対照としてACAT阻害活性が知られている化合物FR179254(終濃度10μM、メルク社製、344235)を添加する区分を設定した。この後、0.05mCi/mLのOleoyl Coenzyme A, [oleoyl-9,10-³H]- (モラベックバイオケミカルズ社製、MT1649)2μLと0.2mg/mLのOleoyl Coenzyme A(ICN社製、591-20521)5μLの混合液を各チューブに添加し混合後、37°Cで5分保温した。その後イソプロパノール:ヘプタン=4:1(容量比)の溶液を各チューブに0.5mLずつ添加することで反応を停止した。各チューブに0.2mLの0.1M リン酸カリウム溶液(pH7.4)および0.3mLのヘプタンを添加し15秒間攪拌後、15秒間遠心分離を行い、得られた上層150μLを用いてウルチマゴールド(パーキンエルマーライフサイエンス社製、6013329)をシンチレーションカクテルとして液体シンチレーションカウンターLS6500(ベックマン社製)により放射活

性を測定した。なお、各反応は2連で行い、放射活性は平均値を算出した。被験サンプルのACAT阻害活性(%)は以下の式により陽性対照である10 μ MのFR179254を添加したときの阻害率を100%とすることにより算出した。

[0059] 阻害活性(%) = $\{([\text{対照区分の放射活性(cpm)}] - [\text{被験サンプル添加区分の放射活性(cpm)}]) / ([\text{対照区分の放射活性(cpm)}] - [\text{10 } \mu \text{ MのFR179254添加区分の放射活性(cpm)}])\} \times 100$

[0060] この結果、3'-アセトキシ-4'-チグロイルオキシ-3', 4'-ジハイドロセセリンの阻害活性は164%であり、顕著なACAT阻害活性が認められた。

[0061] 本発明により、3'-アセトキシ-4'-チグロイルオキシ-3', 4'-ジハイドロセセリン、その誘導体及び／又は薬学的に許容されるそれらの塩を含有するACAT阻害剤、それを含有する医薬、食品又は飼料が提供される。該医薬は動脈硬化症や高脂血症、これらが原因因子となって起こる疾患の治療剤又は予防剤として有用である。また、該食品は、日常の食品として摂取することにより、上記疾患の症状改善や予防が可能となる。従って、本発明の有効成分を含有する食品はそのACAT阻害作用により、生体の恒常性の維持に有用な機能性食品である。

請求の範囲

- [1] 3'-アセトキシ-4'-チグロイルオキシ-3', 4'-ジヒドロセセリン、その誘導体及び薬学的に許容されるそれらの塩からなる群より選ばれる一種以上を有効成分として含有することを特徴とする、アシルCoAコレステロールアシルトランスフェラーゼ阻害剤。
- [2] 請求項1記載の阻害剤を含有することを特徴とする医薬。
- [3] 請求項1記載の阻害剤を含有することを特徴とする食品又は飼料。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/064634

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D493/04(2006.01)i, A23K1/16(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61K31/37(2006.01)i, A61K36/23(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D493/04, A23K1/16, A23L1/30, A61K31/37, A61K36/23, A61P3/06, A61P9/10, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2007	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2007

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/074906 A1 (Takara Bio Inc.), 18 August, 2005 (18.08.05), Full text (Family: none)	1-3
P, X	WO 2006/082743 A1 (Takara Bio Inc.), 10 August, 2006 (10.08.06), Full text (Family: none)	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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 doubts 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
29 August, 2007 (29.08.07)

Date of mailing of the international search report
11 September, 2007 (11.09.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07D493/04(2006.01)i, A23K1/16(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61K31/37(2006.01)i, A61K36/23(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07D493/04, A23K1/16, A23L1/30, A61K31/37, A61K36/23, A61P3/06, A61P9/10, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 7 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 7 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 7 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	W O 2 0 0 5 / 0 7 4 9 0 6 A1 (タカラバイオ株式会社) 2 0 0 5 . 0 8 . 1 8, 文献全体 (ファミリーなし)	1 - 3
P, X	W O 2 0 0 6 / 0 8 2 7 4 3 A1 (タカラバイオ株式会社) 2 0 0 6 . 0 8 . 1 0, 文献全体 (ファミリーなし)	1 - 3

☐ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 9 . 0 8 . 2 0 0 7

国際調査報告の発送日

1 1 . 0 9 . 2 0 0 7

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

金谷 安紀子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

4 C

3 3 3 6