(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3682721号
(P3682721)
(45)発行日　平成17年8月10日(2005.8.10)　(24)登録日　平成17年6月3日(2005.6.3)

(51)Int.Cl.[7]　F I
C07D 311/32　C07D 311/32
A61K 31/35　A61K 31/35 ADY
A61K 31/35 ADZ

請求項の数 5　(全 34 頁)

(21)出願番号　特願平4-505116
(86)(22)出願日　平成4年2月14日(1992.2.14)
(65)公表番号　特表平6-508103
(43)公表日　平成6年9月14日(1994.9.14)
(86)国際出願番号　PCT/SE1992/000090
(87)国際公開番号　WO1992/014458
(87)国際公開日　平成4年9月3日(1992.9.3)
審査請求日　平成11年2月3日(1999.2.3)
審判番号　不服2002-5969(P2002-5969/J1)
審判請求日　平成14年4月8日(2002.4.8)
(31)優先権主張番号　656,801
(32)優先日　平成3年2月15日(1991.2.15)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　809,420
(32)優先日　平成3年12月17日(1991.12.17)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　502124721
フォッケルマン　ジャスミン
スウェーデン　エス－２６０７０　リュン
グビーヘッド　ペーエル　８６２
(73)特許権者　502124732
フォッケルマン　ミッシェル
スウェーデン　エス－１１４５４　ストッ
クホルム　スティルマンスガタン　２３
(74)代理人　100059959
弁理士　中村　稔
(74)代理人　100067013
弁理士　大塚　文昭
(74)代理人　100065189
弁理士　宍戸　嘉一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗菌、抗ウイルスまたは免疫刺激剤として使用するためのベンゾピランフェノール誘導体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

製薬上許容される担体中に蜂蝋抽出物を含有する、殺菌又は免疫刺激用の非アルコール水性組成物であって、前記抽出物が、ピノセンブリン、ピノバンクシン-3-アセテート及びナリンゲニンを含有することを特徴とする組成物。

【請求項２】

ヒト又は獣医学用の請求項１に記載の組成物。

【請求項３】

前記担体が生理塩溶液である請求項１に記載の組成物。

【請求項４】

以下の工程、

（１）蜂蝋を含むアルコール溶液を、水又は0.1-17重量％のNaClを含有する水溶液に、30-95℃にて添加する工程；

（２）得られた混合物を30-95℃にて10-100時間維持してアルコールを除去する工程、及び、

（３）底部沈殿物のない溶液を得る工程；

を有することを特徴とする、請求項１に記載の組成物を調製する方法。

【請求項５】

前記蜂蝋を含むアルコール溶液が、20℃の温度にて、体積比87:13のエタノール／水混合物で、18～25kHzの超音波を印加しつつ、25分間、密閉系内で蜂蝋を抽出し、次いでこの

生成した懸濁液をデカンテーションし、固体粒子のない透明な蜂蝋抽出物を生成することにより得られる溶液である、請求項４に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

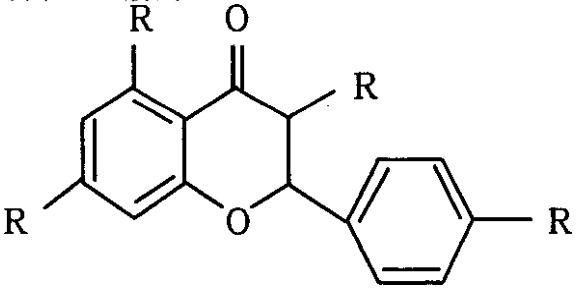
本発明は抗菌、抗ウイルス、免疫刺激または創傷治癒剤として使用するためのベンゾピランフェノール誘導体またはその混合物、該誘導体混合物の製法、並びに少なくとも１種の該誘導体を含有するヒトまたは獣医学で使用するための組成物に関するものである。

本発明の該ベンゾピランフェノール誘導体はある種のウイルス感染（インフルエンザ、ヘルペス）により生じる炎症に対する予防薬として使用でき、また抗炎症剤として使用される。

蜂グルー（bee glue）とも呼ばれる蜂蝋（propolis）は、蜜蜂による天然生成物である。蜜蜂は植物の芽および他の部分上の蜂蝋を採集し、これをその生息環境において、孔および裂け目を形成し、かつまたその巣内で異物体（昆虫および他の生物）から孤立させ、かくして感染の蔓延を防止するのに利用している。蜜蜂はまた、蜂の巣のセルに蜜および花粉などの物質を貯蔵する前に該セルを被覆するためにこの蜂蝋を利用している。

蜂蝋は60種以上の化合物からなる特異的、複雑な生活性をもつ物質である。その基本的な成分は種々の樹脂、蝋、エーテル性オイルおよび花粉である。更に、蜂蝋の主な生活性成分は植物染料であり、その最も重要なものはフラボン類および黄色染料、例えばクリシンまたはテクトクリシン、フラボノン類（flavonones）、例えばピノストロビン、ピノセンブリンおよびクエルセチンおよびその誘導体並びにフラボノール類、例えばラムノシトリン、ガランギンおよびイソアルピニン（isoalpinin）である。これはまた芳香物質、例えばイソバニリンおよびアセトキシベツリノール（acetoxybetulinol）、並びに芳香族酸、例えば桂皮酸、安息香酸、カフェー酸、フェルラ酸およびプロトカテチュー酸並びにそのベンジルアルコール、ペンタノール、フェニルエチルアルコールおよびシンナミルアルコールとのエステルなどをも含む（E.M. シュナイデビント（Schneidewind）, A.ブライジ（Brige）, H. カラ（Kala）, J.メツナー（Metzner）&A.ツンケ（Zsunke）, in Die Pharmazie, 1979, No. 34, p. 103）。

以下の一般式Ｉ：




（ここで、Ｒは同一または異なっていてもよく、各々Ｈ、OHまたは$CH_3$-CO-Oを表す）で示される化合物が、蜂蝋よりも良好な効果を有する薬物である抗菌、抗ウイルスまたは免疫刺激剤として使用できる蜂蝋中の成分であることが今や明らかとなった。

本発明は、特にピノセンブリン（4h-1-ベンゾピラン-4-オン、2,3-ジヒドロ-5,7-ジヒドロキシ-2-フェニル）、ピノバンクシン-3-アセテート（4H-1-ベンゾピラン-4-オン、2,3-ジヒドロ-5,7-ジヒドロキシ-2-フェニル-3-アセテート）、およびナリンゲニン（Naringenin）（5,7,4'-トリヒドロキシ-2,3-ジヒドロ-2-フェニル-1,4-ベンゾピラン）または5,7,4'-フラバノンを抗菌、抗ウイルスまたは免疫刺激剤として使用することに関する。

本発明は、また上記一般式Ｉの化合物の混合物および特にピノセンブリン、およびピノバンクシン-3-アセテートおよびナリンゲニンの混合物にも関する。好ましくは、これら３種の化合物は治療において一緒に使用する。本発明に従って製造された抽出物はプロピノコム（Propinocom）と呼ばれ、以下PRP-Cと略称することとする。

本発明は、更に上記一般式Ｉで示される物質の混合物の製造法にも関する。本発明の方法によれば、蜂蝋生成物を水または塩、好ましくは製薬上許容される塩を含む水溶液で抽出する。本発明者は先ず0.9重量％のNaCl溶液（生理的塩化ナトリウム溶液）を使用して、

ヒトまたは獣医学で使用するための抽出物を生成した。しかしながら、この抽出に水が使用できること並びに純水を使用することにより該抽出操作時間が短縮できることが明らかとなつた。従って、水による抽出が好ましい。しかしながら、塩溶液を使用することも可能であり、任意の塩が使用できる。好ましくは、製薬上許容される塩、例えばNaClまたはKClが使用される。この抽出に水を使用した場合、生成物は凍結乾燥される。また、塩溶液を使用した場合には、生成物を先ず透析して該塩を除去する。抗菌剤として使用する場合には、塩溶液による抽出が好ましい。この生成物を抗菌剤として使用するためには、該抽出生成物は0.5～２重量％、好ましくは0.9重量％、例えば0.9%のNaClを含むことができる。

本発明によれば、該蜂蝋生成物は、好ましくは有機溶媒溶液、例えば蜂蝋を含有するアルコール性溶液である。このアルコール性溶液を、温度30～95℃にて、0.1～17重量％のNaClを含む水性溶液または水に添加し、この混合物を温度30～95℃にて10～100時間維持し、その後該溶液から底部の沈殿物を除去する。

該アルコールは、炭素原子数１～20、好ましくは１～５のアルコール、例えばメタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、、特にエタノールであり得る。好ましくは、ドイツ特許第88109824.8号に従って調製したエタノール性蜂蝋溶液を使用する。

本発明によれば、エタノール性蜂蝋生成物は、低温（0～20℃）にて、容積比87:13のエタノール／水混合物を使用して、約18～25kHzの超音波を印加しつつ、短時間例えば25分間に渡り閉鎖系で蜂蝋を抽出し、生成する懸濁液をデカンテーションして、固体粒子を含まない透明な蜂蝋抽出物を得ることにより調製できる。好ましくは、該蜂蝋を抽出前に粒径３mmにまで粉砕する。該蜂蝋を適当なミル中で微粒子（最大径５mm）にまで粉砕する。上記のドイツ特許第88109824.8号を本発明の参考文献とする。

このアルコール溶液は、好ましくは水または塩溶液に、これら２種の溶液の体積の和として計算して、１～60容量％の量で添加する。

該蜂蝋溶液を、好ましくは約１～７時間、好ましくは５時間掛けて該水または塩溶液に滴下する。褐色の沈殿物が形成される。この混合物を更に5～100時間、好ましくは約40～80時間、30～95℃に維持する。温度は、好ましくは50～70℃、特に60℃である。淡い黄色の溶液が硬質で暗褐色の沈殿物上に形成される。このアルコール性蜂蝋溶液をこの工程中に蒸発させ、生成する黄色の抽出物は使用したNaCl溶液の体積とほぼ同じ体積を有する。

本発明の物質および組成物はヒトおよび獣医用途用の抗生物薬として使用できる。これらはグラム陽性またはグラム陰性バクテリア、ウイルスおよび菌類により発生する炎症または感染を防止し、もしくは治療するために使用できる。該物質またはその混合物を家畜の飼料、食料品、衛生物品、医薬品および天然薬品として使用できる。これらは、また免疫刺激剤、例えばアジュバント、並びに防腐剤および鎮痛剤として使用して、創傷の治癒過程を改善することもできる。以下に議論するテストは、本発明の抽出物が胃潰瘍および膣感染を生ずるバクテリアに対しても有利に使用できることを示している。

本発明の抽出物は、更に飼料および食料品用の容器並びに器具の調製、並びに外科用器具、歯科用器具、化粧器具、例えば注射器、包帯、ギブス、手当用品、圧迫包帯およびリンス液などの処置のためにも使用できる。更に、これらは手術室、動物の飼育室、食品並びに飼料を調製しまたは保存するための場所などのあらゆる種類の空間の処置のためにも使用できる。これらが免疫刺激活性を有することから、ワクチン中のアジュバントとしても利用できる。

本発明の抽出法を使用する場合、ピノセンブリン、ピノバンクシン-3-アセテート、およびナリンゲニンを含む生成物が得られる。この抽出物は、好ましくは0.6～0.9%好ましくは0.9%のNaClを含有する生理液を含むように調節できる。乳房炎、即ち乳房中の炎症などのバクテリア感染を治療もしくは予防するのに極めて適している。この塩溶液抽出物は無菌条件下で調製でき、乳房に直接注入することができる。今日使用されている「プロベット（Provet）；商標」は粗製蜂蝋（アピファーム社（Apipharm Co., Ltd））、ラナコルム（Lanacolum）、アルコール－セチル－ステアレート、ポリオキシエチレン－ソルビタン－モノラウレート、ワセリンおよびパラフィンを含有する。この製品「プロベット」は

、疾患のある哺乳動物の各乳頭の乳管に搾乳の完了後に導入する必要がある。「プロベット」は、従って該乳頭の各々への注入のための４種の使い捨て注射器からなる。従って、本発明の組成物は従来の製品よりも投与が容易である。
本発明の該混合物の免疫刺激効果は、胸腺および脾臓由来の細胞（バンド（Band）T-リンパ細胞およびナチュラルキラー細胞（NK細胞））につき直接テストした。これらのテストにおいて、該混合物は高い免疫刺激効果を示した。また、本発明の組成物を飼料を通して動物に投与したところ、胸腺および脾臓両者におけるタンド（Tand）B-細胞の活性増加を生じた。本発明の組成物は体液性および細胞媒介免疫応答両者を高める。
コクサッキーウイルスB3（CB3）に感染したマウスにおいて、その生存時間は本発明の組成物で予防処置したマウスについて有意に延長された。
全体で58名の患者に１～10%を鼻孔散布してテストした場合、局所的または全身的なアレルギー反応は何等観察されなかった。
本発明の物質および組成物は、任意の剤形、例えば錠剤、カプセル、注射用溶液、経鼻治療用の溶液またはスプレーとして使用できる。
これらの投与剤形は製薬上許容される担体、例えば１種以上の相容性固体充填剤希釈物または該剤形の製造を補助するために添加される固体または液体物質、例えば摩擦を減ずるための滑剤および該粒状混合物の流動性を改善するためのグリダント（glidants）などを含むことができる。ここで使用する「相容性（compatible）」なる用語は、該成分が薬剤の有効性を実質的に減ずるような相互作用を生ずることなしに、相互に混和し得ることを意味する。
製薬上の担体として機能し得る物質の幾つかの例は、糖類例えばラクトース、グルコースおよびスクロール、澱粉例えばコーンスターチおよび馬鈴薯澱粉、セルロースおよびその誘導体例えばナトリウムカルボキシメチルセルロース、エチルセルロースおよびセルロースアセテート、粉末化したトラガカンスゴム、モルト、ゼラチン、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸亜鉛、硫酸カルシウム、二酸化珪素、食用油例えばピーナッツオイル、綿実油、ゴマ油、オリーブオイル、コーン油およびココアバター、ポリオール例えばプロピレングリコール、ソルビトール、マニトールおよびポリエチレングリコール、寒天およびアルギン酸、並びに薬理処方物に使用されている他の無毒の相容性物質である。湿潤剤、例えばラウリル硫酸ナトリウム並びに着色剤、滑剤、賦形剤、安定化剤、酸化防止剤、および保存剤を含むこともできる。
経鼻治療のためには、0.9質量％のNaClおよび1-20%の蜂蝋抽出物を含有する生理的NaCl－溶液を使用できる。乳房炎の治療のためには、20-50%、好ましくは30%の蜂蝋抽出物を含有する0.9重量％のNaCl溶液を使用できる。

【図面の簡単な説明】

第1a図は温度勾配、４種の領域A-D、および全イオン流を含む、透析した生成物のマススペクトルを示す図である。
第1b図は数値で示した濾過後の全イオン流を示す図である。
第1c図は第1a図の領域Ａにおけるスペクトルを示す。
第1d図は第1a図の領域Ｂにおけるスペクトルを示す。
第1e図は第1a図の領域Ｃにおけるスペクトルを示す。
第1f図は第1a図の領域Ｄにおけるスペクトルを示す。
第2a図～第2f図は、それぞれ透析した生成物に対して第1a図～第1f図に示したような、未透析生成物の対応するスペクトルを示す図である。
第３図は実施例５のマススペクトルの結果を示す図であり、ここで（1）は全イオンのクロマトグラムであり、（2）はクロマトグラム１の解析により得られた全ピークに対するマススペクトルを示し、（3）は内部標準を使用した全イオンのクロマトグラムを示し、（4）は該内部標準の全イオンクロマトグラムを示し、（5）は実施例５のGC-MSであり、（6）は内部標準を使用した実施例５のGC-MSでありおよび（7）は該内部標準のマススペクトルを示す。
第４図は、脾臓および胸腺におけるT-（Con A）のおよびインビボでの蜂蝋処理後の脾臓

中のB-細胞（LPS）の免疫細胞活性を示す図である。
第５図は未処理および蜂蛹で処理したBalb/cマウス中のコクサッキーウイルスB3の生存性を示す図である。
第６図は実施例８、９および10の生成物のマススペクトルを示す図である。ここで
ａは内部標準（IS）、ピノセンブリン-7-メチルエーテルのGC-MS、全イオンクロマトグラムであり、
ｂはａにおける解析の結果得られたピノセンブリン-7-メチルエーテルのマススペクトルであり、
ｃは実施例9aのGC-MS、全イオンクロマトグラムであり、
ｄはｃにおける解析の結果得られたピノセンブリンおよびピノバンクシン-3-アセテートのマススペクトルであり、
ｅは内部標準を使用して得た実施例9aのGC-MS、全イオンクロマトグラムであり、
ｆはｅでの解析の結果得られたピノセンブリン、ピノバンクシン-3-アセテートおよびピノセンブリン-7-メチルエーテル（IS）のマススペクトルであり、
ｇは実施例9bの全イオンクロマトグラムであり、
ｈは実施例9bのマススペクトルであり、
ｉは実施例9b＋内部標準の全イオンクロマトグラムであり、
ｊは実施例9b＋内部標準のマススペクトルであり、
ｋは実施例８の全イオンクロマトグラムであり、
ｌは実施例８のマススペクトルであり、
ｍは実施例８＋内部標準の全イオンクロマトグラムであり、
ｎは実施例８+内部標準のマススペクトルであり、
ｏは実施例10の全イオンクロマトグラムであり、
ｐは実施例10のマススペクトルであり、
ｑは実施例10＋内部標準の全イオンクロマトグラムであり、
ｒは実施例10＋内部標準のマススペクトルである。
本発明の諸特徴および種々の利点は以下の実施例を参照することにより、より一層明確なものとなろう。しかしながら、該実施例により本発明を何等限定するものではない。
実施例１：（出発物質の調製）
抽出容器内に、87重量％以下のエタノールの水溶液500ｌを調製した。この混合物を攪拌しつつ、20kgの粉砕した蜂蛹に該注出器の内容物に添加した。このバッチを25分間超音波（18-25kHz）抽出にかけ、次いで２時間放置し、デカンテーションし、濾過した。
該濾過は迅速濾紙装入器（rapid filter-paper inserts）を備えた加圧濾過器で実施した。得られた透明な蜂蛹抽出物を、ヒートポンプにより、150-50mm$H_2O$の真空下で、カラム濃縮器内で、所定の乾燥物質の濃度５～80%の範囲に濃縮した。この濃縮は最大20℃の温度にて実施した。
実施例２
実施例１で得た抽出物を希釈して、該抽出物をエタノール中に乾燥物質基準の濃度で10重量％を含む溶液を得た。蒸留水に濃度0.9%となるようにNaClを溶解した。この溶液700mlをビーカーに入れ、これを水浴上に配置した。該ビーカーの温度を30℃に維持した。エタノール中に10重量％の該蜂蛹を含有する蜂蛹抽出物300mlを、約５時間に渡り該NaCl溶液に滴下した。泥褐色の沈殿が得られた。この溶液の温度を、該水浴を沸騰状態に維持することにより、かつ該水溶中の水のレベルを維持するために15時間に渡り連続的に水を添加することにより制御した。かくして、淡い褐色の溶液が形成され、その体積は700mlであった。該溶液の残部は該加熱中に蒸発した。該溶液を含有するビーカーを、その内容物が室温に達するまで該水浴中に放置した。該沈殿を該溶液から除去した。この黄色溶液のマススペクトルによる分析は、該溶液がピノセンブリンおよびピノバンクシン-3-アセテートを含有することを示した。
実施例３
実施例１で得られた抽出物を希釈して、該抽出物をエタノール中に乾燥物質基準で10重量

％含む溶液を得た。NaClを10％の濃度となるように蒸留水に溶解し、該溶液700mlをビーカーに入れ、これを水浴上に配置した。該ビーカーの温度を30℃に維持した。エタノール中に10重量％の蜂蝋を含有する該蜂蝋抽出物300mlを、約５時間に渡り該NaCl溶液に滴下した。泥褐色の沈殿が得られた。この溶液の温度を、該水浴を沸騰状態に維持することにより、かつ該水浴中の水のレベルを一定に維持するために15時間に渡り連続的に水を添加することにより制御した。かくして、淡い褐色の溶液が形成され、その体積は700mlであった。該溶液の残部は該加熱中に蒸発された。該溶液を含有するビーカーを、その内容物が室温に達するまで該水浴中に放置した。該沈殿を該溶液から除去した。

実施例４

実施例１で得られた抽出物を希釈して、この抽出物をエタノール中に乾燥物質基準で10重量％含む溶液を得た。NaClを15％の濃度となるように蒸留水に溶解し、該溶液700mlをビーカーに入れ、これを水浴上に配置した。該ビーカーの温度を30℃に維持した。エタノール中に10重量％の蜂蝋を含有する該蜂蝋抽出物300mlを、約５時間に渡り該NaCl溶液に滴下した。泥褐色の沈殿が得られた。この溶液の温度を、該水浴を沸騰状態に維持することにより、かつ該水浴中の水のレベルを維持するために15時間に渡り連続的に水を添加することにより制御した。かくして、淡い褐色の溶液が形成され、その体積は700mlであった。該溶液の残部は該加熱中に蒸発された。該溶液を含有するビーカーを、その内容物が室温に達するまで該水浴中に放置した。該沈殿を該溶液から除去した。

実施例５

実施例２の手順を繰り返した。但し、800mlのNaCl溶液および200mlの該蜂蝋抽出物を使用した。得られた溶液を以下の如くして、マススペクトル法により分析した。該黄色の抽出物２mlを２mlの酢酸エチルで抽出した。該酢酸エチル相の１および５μｌを、ジェオール（Jeol）300マススペクトロメータに結合したガスクロマトグラムに注入した。このガスクロマトグラムは、無極性の固定相をもつ15mの長いキャピラリーカラムを備えていた。連続的な注入を240℃にて１分間行い、45℃にて１分間、10℃／分の温度プログラムでガスクロマトグラフィーを実施した。このマススペクトル分析パラメータは、質量35～300に対して、EI 70 EV、1.2秒／走査であった。抽出を実施する前に、内部標準として0.7μg/mlのピノセンブリン-7-メチルエーテル430μｌを試料に添加した。

この内部標準ピノセンブリン-7-メチルエーテルは該試料中にも存在しており、これが分析を困難にする。該内部標準を使用可能なものとするために、該試料を該内部標準の存在下、または不在下でクロマトグラフ処理し、該内部標準による妨害を差引きできるようにした。ピノセンブリンおよびピノバンクシン-3-アセテートが基準スペクトルにより同定された。

この結果を第３図に示した。クロマトグラム１は全イオンクロマトグラムを示す。クロマトグラム２はクロマトグラム１の解析から得た全ピークに対するマススペクトルである。クロマトグラム３は内部標準を使用した場合の全イオンクロマトグラムである。クロマトグラム４は内部標準の全イオンクロマトグラムである。クロマトグラム５は内部標準を使用した場合の実施例５のGC-MSである。クロマトグラム６は内部標準を使用した場合の実施例５のGC-MSであり、クロマトグラム７は該内部標準のマススペクトルである。コントロールスペクトルは酢酸エチルに可溶性の物質を何等含まない。

これらの結果は、0.9%NaCl溶液である該抽出物２mlが200ng/ml（$20\times10^{-8}$g/ml）のピノセンブリンおよび90ng/ml（$90\times10^{-9}$g/ml）のピノバンクシン-3-アセテートを含有することを示す。該抽出物中には検出可能な他の成分を含まない。

実施例６

実施例２の手順を繰り返した。但し、770mlのNaCl溶液および230mlの該蜂蝋抽出物を使用した。

実施例７

実施例２の手順を繰り返した。但し、500mlのNaCl溶液および500mlの該蜂蝋抽出物を使用した。

生成した淡い黄色の溶液を水に対して透析することにより更に精製した。この抽出物50ml

をチューブ（モデル（Model）mwカタフ（cataf）3500ケボ（Kebo）ABスウェーデン）を通して蒸留水250mlに対して透析した。
透析しなかったおよび透析した溶液両者を固体プローブ（Solid Probe）/μｓにてマススペクトル法によりテストした。１μｌの該テスト溶液と96%p.a. EtOH 1:1との混合物を約60℃にて蒸発させ、25℃に冷却し、次いで10℃/sにて375℃まで加熱した。該温度を約４分間維持した。サイクル1sでm/2 41-641からのマススペクトルをこの期間中調べた。該透析生成物のマススペクトルを第１図に示した。該第１図において、それぞれ第1a図は温度勾配、４種の領域A-Dおよび全イオン流を示し、第1b図は数値で示した濾過後の全イオン流を示し、第1c図は第1a図の領域Ａにおけるスペクトルを示し、第1d図は第1a図の領域Ｂにおけるスペクトルを示し、第1e図は第1a図の領域Ｃにおけるスペクトルを示し、かつ第1f図は第1a図の領域Ｄにおけるスペクトルを示す。第2a図～第2f図は、それぞれ未透析生成物の対応する同様なスペクトルを示す図である。これらのマススペクトルは該生成物がピノセンブリンおよびピノバンクシン-3-アセテートを含有することを示しているものと解釈される。

実施例８

実施例７の手順を繰り返した。但し、該蜂蝋抽出物を該NaCl溶液に滴下した後に、該混合物を60℃にて76時間加熱した。得られた黄色の抽出物を生成する沈殿から分離し、分析した。実施例７とは別のもう一つの透析装置を使用した。該黄色溶液のマススペクトルによる分析は該溶液がピノセンブリン、ピノバンクシン-3-アセテートおよびナリンゲニンを含むことを示す。

実施例９

実施例２の手順を繰り返した。但し、該蜂蝋抽出物を該NaCl溶液に滴下した後に、該混合物を60℃にて78時間に渡り加熱した。実施例７とは別にもう一台の透析装置を使用した。得られた黄色溶液のマススペクトルによる分析は該溶液がピノセンブリン、ピノバンクシン-3-アセテートおよびナリンゲニンを含むことを示す。

実施例10

出発物質を実施例１と同様に調製し、透明な蜂蝋抽出物を濃度が20重量％となるまで濃縮した。その後、実施例７の手順を繰り返した。但し、該蜂蝋抽出物を該NaCl溶液に滴下した後に、該混合物を60℃にて72～78時間に渡り加熱した。実施例７とは別にもう一台の透析装置を使用した。得られた黄色溶液のマススペクトルによる分析は該溶液がピノセンブリン、ピノバンクシン-3-アセテートおよびナリンゲニンを含むことを示す。この抽出物は抗ウイルス剤として適しており、例えば免疫系の刺激を介して作用する（実施例15）。
実施例８、９および10の生成物をガスクロマトグラフィー－マススペクトル法により分析した。
分析法
内部標準（IS）：$3.2\times10^{-5}$g/mlのピノセンブリン-7-メチルエーテル
１：１mlの試料を１mlの酢酸エチルで抽出した。
２：添加された0.1mlの内部標準を含む１mlの試料を１mlの酢酸エチルで抽出した。
３：２μｌの各酢酸エチル相をガスクロマトグラフィー－マススペクトル分析装置（GC-MS）上に注入した。
GCプログラム
カラム：無極性の固定相を有する寸法15m×0.25mmのもの。
注入：280℃にて連続式に１分間。
温度プログラム：60℃にて（１分間）から５℃／分にて280℃まで。
マススペクトル分析装置のパラメータ
走査：1.2秒間にm/z 30-500。
イオン化：電子衝撃（EI）70eV、イオン化電流50μA。
結果
基準スペクトルの助けによって、ピノセンブリンおよびピノバンクシン-3-アセテートを同定した。

実施例9a、9b、８および10の分析は、ピノセンブリンの量に関連する以下の結果を与えた。

| 出所 (Prov.) | ピノセンブリンの濃度(mg/l) | ピノバンクシン-3- アセテートの濃度(mg/l) | ナリンゲニンの濃度(mg/l) |
|---|---|---|---|
| 実施例８ | 1.0 | 5.3 | 52 |
| 実施例9a | 5.3 | 5.9 | 45 |
| 実施例9b | 5.6 | 7.8 | 58 |
| 実施例10 | 10.0 | 13.0 | 59 |

コメント：ここに与えたピノセンブリンおよびピノバンクシン-3-アセテートの濃度は該試料中におけるこれら化合物の量に関する示唆を与えるものと理解すべきである。例えば、ピノセンブリン、ピノバンクシン-3-アセテート、ナリンゲニンおよびピノセンブリン-7-メチルエーテル（標準）間の抽出回収率に関する差異、およびこれら化合物と該標準との間の該マススペクトル分析装置に関する応答における差異のために、これらの濃度には大きな誤差がある可能性がある。ピノセンブリンおよびピノバンクシン-3-アセテートの量のより精度の高い分析を実施するためには、標準として純粋な形状のこれら化合物を使用する必要がある。

上記実施例１～10はNaCl溶液の代わりに水溶液を使用して繰り返すことができる。

実施例11

実施例10を繰り返した。但し、500mlの水および20重量％の蜂蝋抽出物500mlを使用した。温度は60℃に維持し、抽出時間を32時間とした。

実施例12：実施例２および５の抽出物の殺菌作用のテスト

以下の菌株をテストした。クレブシエラ・オキシトカ（Klebsiella oxytoca）（K1）、シュードモナス・アエルギノーザ（Pseudomonas aeruginosa）（P.a）、コアギュラーゼ－ネガティブスタフィロコクシ（staphylococci）（SK-）、ストレプトコッカス・ウベリス（Streptococcus uberis）（Sru）、ストレプトコッカス・アガラクチアエ（Streptococcus agalactiae）（Sra）、プロテウス・ミラビリス（Proteus mirabilis）（P.m）、アクチノマイセス・パイオゲネス（Actinomyces pyogenes）（A.p）、サッカロマイセス・セレビシアエ（Saccharomyces cerevisiae）（S.ce）、カンディダ・シュードトロピカリス（Candida pseudotropicalis）（C.ps）、（クルベロマイセス・マルキシアヌス（Kluveromyces marxianus））。

成育テストまえに実施した滅菌性に関するコントロールテストにおいて、これら４種の蜂蝋溶液は負であった。全ての菌株を一度にテストした。ウシブロス中で37℃にて20時間これら菌株を培養したところ、これらのブロスは１ml当たり$10^6$-$10^9$個の微生物を含んでいた（表Ｉを参照のこと）。

各ブロスから0.1mlの試料を採取し（$10^2$～$10^3$の希釈率）、これらを実施例２または５に従って該抽出物0.9mlに添加して、各混合物が$10^2$-$10^5$個/mlのバクテリアを含むようにした（表ＩＩを参照のこと）。次いで、これらの溶液を38℃にてインキュベートした。０および３時間後に、バクテリア数を計数した。結果を表III～IVに与えた。培養の３時間後に、該培養物中にバクテリアは観測されなかった。このことは、テストした各バクテリアが、実施例２および５のテストされた抽出物中で、インキュベートの３時間後に死滅したことを意味する。

表Ｉ：ブロス中のバクテリア数

| バクテリア | テスト１（実施例２） | テスト１（実施例２） |
|---|---|---|
| K1 | $1.5\times10^{9}$ | $2.0\times10^{9}$ |
| P.a | $4.0\times10^{9}$ | $12\times10^{9}$ |
| SK- | $5.5\times10^{9}$ | $5.0\times10^{9}$ |
| Sru | $9.5\times10^{8}$ | $3.5\times10^{8}$ |
| Sra | $4.0\times10^{7}$ | $9.5\times10^{7}$ |
| P.m | $2.5\times10^{9}$ | $2.0\times10^{9}$ |
| A.p | $8.5\times10^{9}$ | $1.0\times10^{9}$ |
| S.ce | $1.5\times10^{7}$ | $3.0\times10^{6}$ |
| C.ps | $3.5\times10^{7}$ | $1.7\times10^{7}$ |

表ＩＩ：バクテリア数／ml抽出物

| バクテリア | 実施例２ | 実施例５ |
|---|---|---|
| K1 | $1.5\times10^{5}$ | $2.0\times10^{5}$ |
| P.a | $4.0\times10^{5}$ | $12\times10^{5}$ |
| SK- | $5.5\times10^{5}$ | $5.0\times10^{5}$ |
| Sru | $9.5\times10^{5}$ | $3.5\times10^{5}$ |
| Sra | $4\times10^{4}$ | $9.5\times10^{4}$ |
| P.m | $2.5\times10^{5}$ | $2.0\times10^{5}$ |
| A.p | $8.5\times10^{5}$ | $1.0\times10^{5}$ |
| S.ce | $1.5\times10^{3}$ | $3.0\times10^{2}$ |
| C.ps | $3.5\times10^{3}$ | $1.7\times10^{3}$ |

表III:（時間０）

| バクテリア | 実施例２ | 実施例５ | 実施例５ |
|---|---|---|---|
| K1 | $2.5\times10^{3}$ | $7.5\times10^{4}$ | $5.5\times10^{4}$ |
| P.a | 0 | 0 | 0 |
| SK- | $1\times10^{3}$ | $2.0\times10^{3}$ | $9.0\times10^{3}$ |
| Sru | 0 | 0 | $3.0\times10^{3}$ |
| Sra | 0 | $1.0\times10^{3}$ | $5.0\times10^{2}$ |
| P.m | $2\times10^{5}$ | $9.5\times10^{4}$ | $5.5\times10^{4}$ |
| A.p | 0 | 0 | $1.0\times10^{5}$ |
| S.ce | 0 | 0 | $2.5\times10^{2}$ |
| C.ps | $1\times10^{3}$ | $3.0\times10^{3}$ | $1.1\times10^{3}$ |

表ＩＶ（３時間後）

| バクテリア | | 実施例２ | 実施例５ | 実施例５ |
|---|---|---|---|---|
| K1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P.a | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SK- | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sru | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sra | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P.m | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A.p | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S.ce | 0 | 0 | 0 | 0 |
| C.ps | 0 | 0 | 0 | 0 |

コントロール：該蜂蝋バクテリア懸濁液10mlを３mlのブロスに添加し、37℃にて24時間培養し、プレート上に移し、37℃にて48時間培養した。成育バクテリア数は零であった。
以下の３種の菌株を別のテストで分析した。即ち、スタフィロコッカス・オーレウス（Staphylococcus aureus）、ストレプトコッカス・ディスガラクチアエ（Streptococcus dysgalactiae）およびエシェリヒア・コリ（Escherichia coli）。
全ての蜂蝋溶液をバクテリアの存在につき検査した。これらは何れもバクテリアを含んでいなかった。
これらのバクテリアをブロス中で24時間培養した。これらは１ml当たり$10^{7}$-$10^{8}$個のバクテリアを含んでいた。各ブロスからそれぞれ0.1mlの培養物を取り出し、0.9mlの蜂蝋溶液と混合し、37℃にてインキュベートした。バクテリア数を０、３、24および48時間後に計数した。
結果：３時間の培養後、該培養物中にはバクテリアは検出されなかった。このことは、全てのバクテリアが死滅したことを示している。

実施例13

以下の３種の菌株を別のテストで分析した。即ち、スタフィロコッカス・オーレウス（Staphylococcus aureus）、ストレプトコッカス・ディスガラクチアエ（Streptococcus dysgalactiae）およびエシェリヒア・コリ（Escherichia coli）。
全ての蜂蝋溶液をバクテリアの存在につき検査した。これらは何れもバクテリアを含んでいなかった。
これらのバクテリアを、１ml当たり$10^7$-$10^8$個のバクテリアなる密度となるように24時間培養した。各ブロスからそれぞれ0.1mlの培養物を取り出し、0.9mlの蜂蝋溶液と混合し、37℃にてインキュベートした。バクテリア数を０、３、24および48時間後に計数した。３時間の培養後、該培養物中にはバクテリアは検出されなかった。このことは、全てのバクテリアが死滅したことを示している。

実施例14

以下のバクテリア菌株を使用した。
ヘリコバクター・ピロリ（Helicobacter pylori）NCTC 11736、国際標準菌株
ヘリコバクター・ピロリ（Helicobacter pylori）S-3、スウェーデンオレブロ（Orebro）で単離したもの
ヘリコバクター・ピロリ（Helicobacter pylori）S-6、フィンランドヘルシンキにて単離したもの
ヘリコバクター・ピロリ（Helicobacter pylori）7-88、フィンランドヘルシンキにて単離したもの
カンピロバクター・ジェジュニ（Campylobacter jejuni）S-562、スウェーデンオレブロ（Orebro）で単離したもの
カンピロバクター・ジェジュニ（Campylobacter jejuni）S-261、スウェーデンオレブロ（Orebro）で単離したもの
スタフィロコッカス・エピデルミディス（Staphylococcus epidermidis）、本研究室で保存している菌株
スタフィロコッカス・アガラクチアエ（Staphylococcus agalactiae）Ｂ群、本研究室で保存している菌株
ヘリコバクター群およびカンピロバクター群は２種の重要な腸管病因バクテリアであり、胃腸炎を引き起こす。ヘリコバクター・ピロリ（Helicobacter pylori）は、特に腸管感染の原因であり、かつ消化性潰瘍疾患における原因物質として認識されている。スタフィロコッカス菌株は一般的な病院バクテリア種（common hospital bacterial species）であり、スタフィロコッカス・アガラクチアエ（Staphylococcus agalactiae）は流産を誘発する膣内バクテリアである。上記バクテリアに関する幅広いスペクトルをもつ抗生物質として使用できる、副作用のない抗菌治療法に対する大きな要求がある。現時点では、該バクテリアによる疾患の治療は２種の異なる構成物質と組み合わせたビスマスの使用を含む。
これらのテストで使用する菌株を富化したミューラーヒントンブロス（Mueller Hinton Broth）中で一夜培養する。コロニー形成単位（CFU）はH.ピロリに関しては１×$10^6$/ml～８×$10^7$/mlおよびS.アガラクチアエおよびS.エピデルミディスに対しては２×$10^7$/ml～５×$10^8$/mlの範囲内である。
各ブロス培養物から体積0.1mlの試料を採取し、実施例２および５で得た蜂蝋溶液0.9mlと混合し、37℃にてインキュベートした。０、３、24および48時間後にこれら混合物各々から0.1mlの試料を採取し、血液寒天培地上で培養する。
３時間後には、バクテリアの成育は観測されず、このことはテストしたバクテリアが該テストした溶液中でのインキュベーションの３時間後には死滅したことを意味する。これらテストの各々を少なくとも２回繰り返したが、同一の結果が得られた。

実施例15

本発明の混合物の免疫刺激作用は、胸腺および脾臓由来の細胞（B-およびT-リンパ球およびナチュラルキラー細胞（NK細胞））について直接テストした。これらテストにおいて、該混合物は高い免疫刺激効果を示した。インビボ治療の結果を第４図に示す。本発明の組

成物をも試料を介して動物に与えたところ、胸腺および脾臓両者におけるT-およびB-細胞の高い活性をもたらした。本発明の組成物は体液性および細胞媒介免疫応答両者を高める。

コクサッキーウイルスB3（CB3）に感染したマウスにおいて、本発明の組成物で予防処置したマウスについては該マウスの生存時間は有意に延長された。この結果を第５図に示す。

実施例16：マウスにおける毒性

本発明の生成物の、動物中におけるアジュバントとしての作用に関する情報をる入手するために、実施例10の生成物を投与量１μｇを使用して、マウスにつき調べた。

これらの動物を２群に分けた。各群は６匹の雌12週令のBALB/cマウスからなっていた。

動物の２群に対して該処方物を、皮下（s/c）または腹腔内（i/p）経路の何れかで与えた。

結果

３週間の観察期間中致死効果は何等観察されなかった。しかしながら、s/c経路で接種した６匹の動物中の２匹において僅かな局所的な反応が観察された。この観察された変化は、該注入部位における完全脱毛であった。

実施例17：実施例10の生成物と混合した抗原によるマウスの免疫化

２群（AおよびＢ）の雌の12週令BALB/cマウスを使用した。各群は６匹の動物からなっていた。

この免疫化に使用した抗原（Ag）はウマのヘルペスウイルスタイプ-2（EHV-2）のエンベロープ糖タンパクであった。この抗原の投与量は２種の異なる処方の各々に対して、ブラッドフォード（Bradford）法により測定したタンパク５μｇであった。

これらマウス群を以下の方法で免疫化した。

群Ａにはフロインド不完全アジュバント（FIA）と混合したAgを投与した。

群Ｂには実施例10の生成物１μｇと混合した該抗原を投与した。

これらマウスは４週間の間隔で２回免疫化した。血液試料をそれぞれ該最初の免疫化の４、５および７週間後に採取した。血清を分離し、56℃にて１時間処理することにより不活化した。該エンベロープ抗原に応答する血清の抗体をELISA法に従って測定した。

**表Ｖ**

**５μｇEHV-2 エンベロープ抗原* で免疫したマウスの血清抗体応答（平均値）。A)フロインド不完全アジュバントと混合した抗原を使用、B)実施例10の生成物１μｇと混合した該抗原を使用。結果は依然として抗体応答を呈する希釈率で示した。**

| 動物群 | 免疫化後の期間（週） | | |
|---|---|---|---|
| | 4 | 5 | 7 |
| A | 1/800 | 1/6400 | 1/6400 |
| B | 1/6400 | 1/102 400 | 1/102 400 |

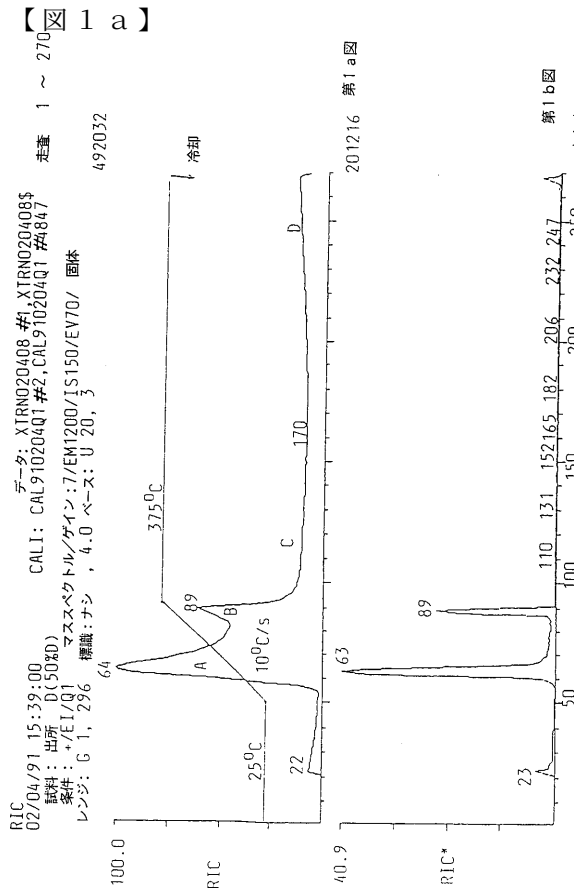
**(*) 動物は４週間間隔で２回免疫化した。**

結果

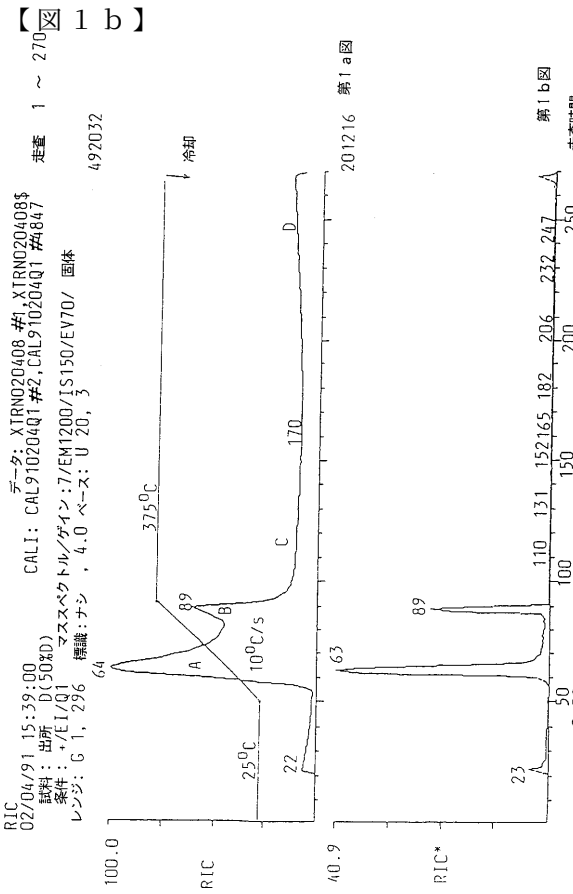
このテストにおいて抗原および実施例10の生成物を投与した動物は、抗原とFIAとの混合物を投与した動物群よりも約16倍も高い抗体価を示す。

以上本発明を特定の実施態様に従って記載してきたが、種々の変更、改良並びに態様が可能であり、従ってこれら全ての変更、改良並びに態様は本発明の精神並びに範囲内に入るものであることを理解すべきである。

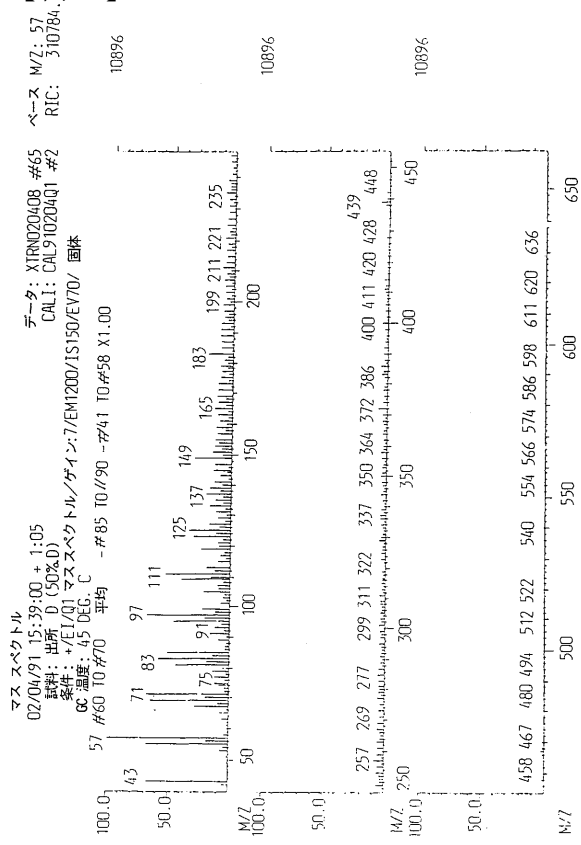
【図１ａ】



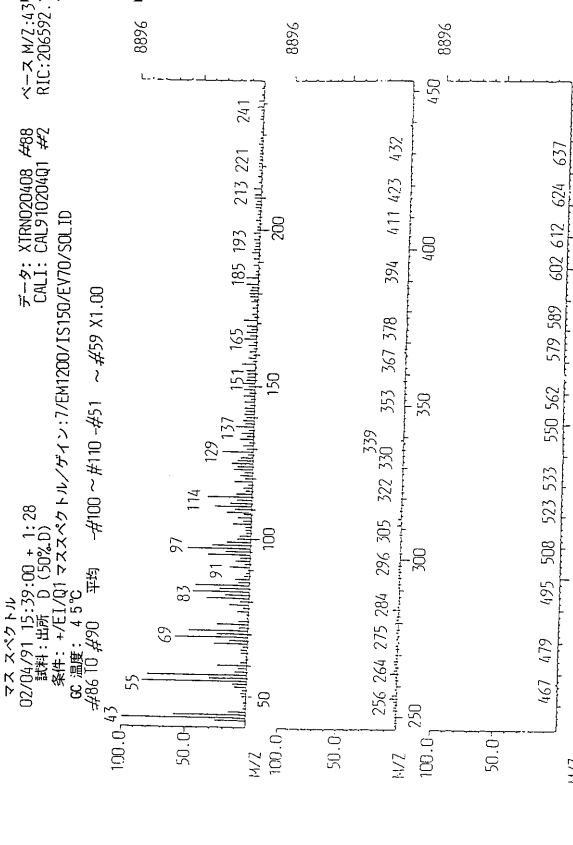
【図１ｂ】



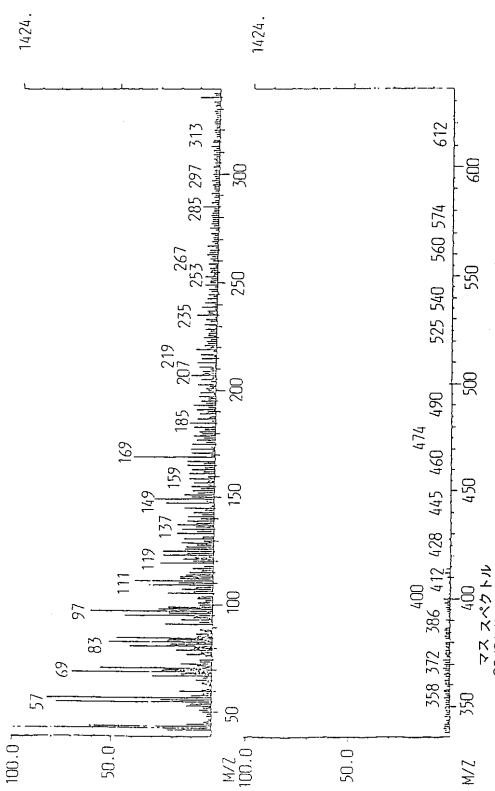
【図１ｃ】



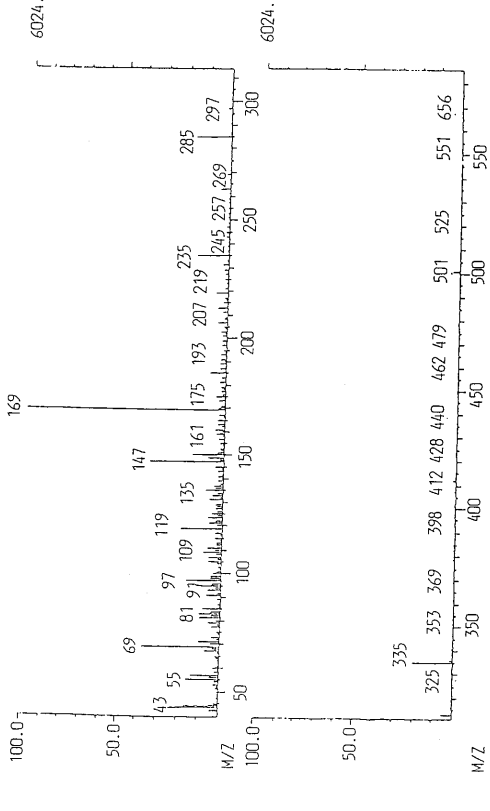
【図１ｄ】



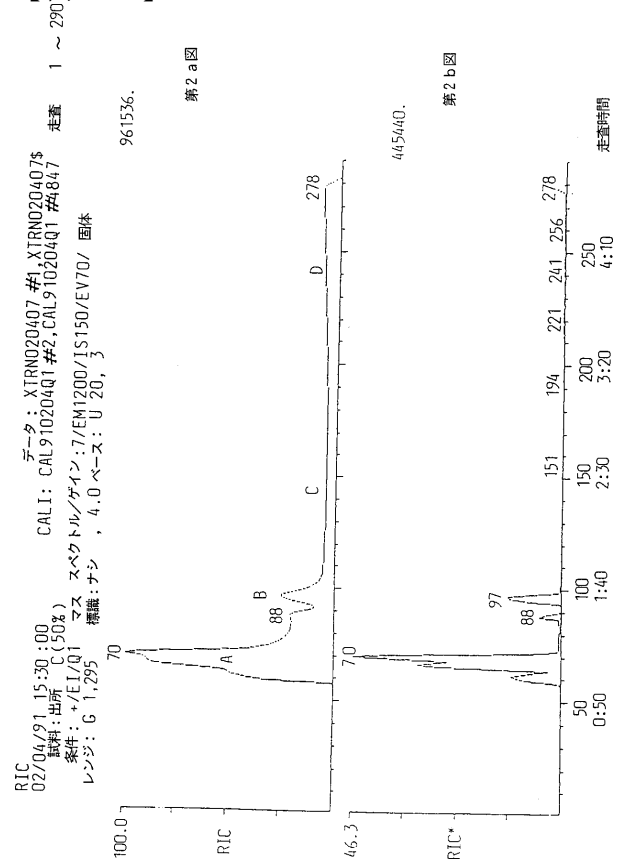
【図１ｅ】



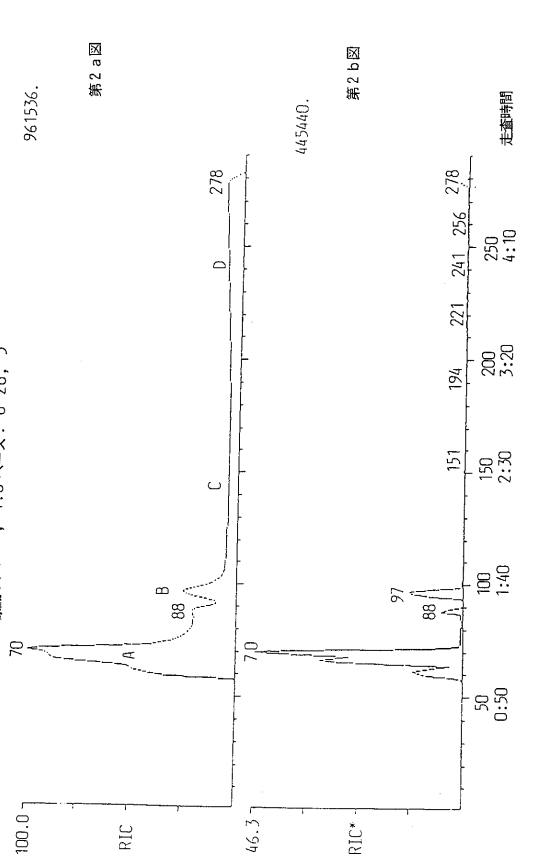

【図１ｆ】



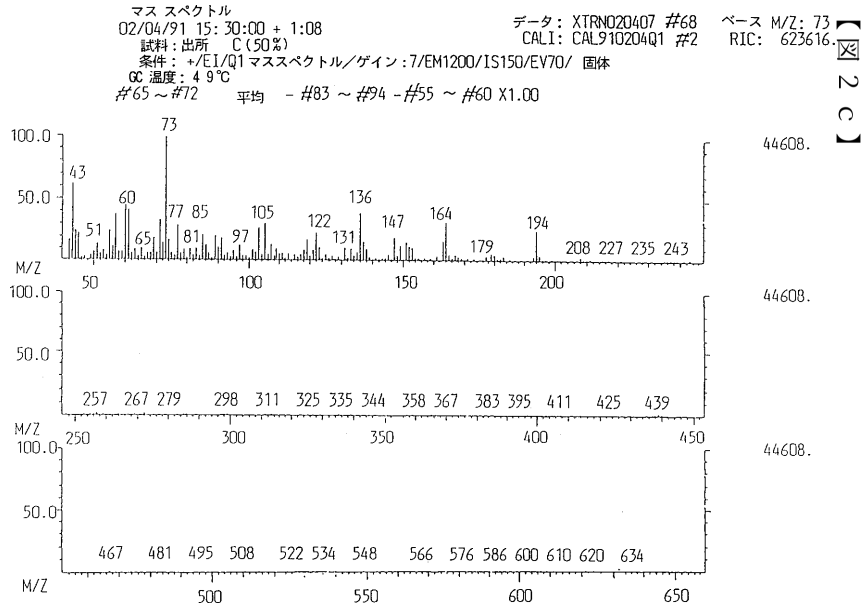

【図２ａ】



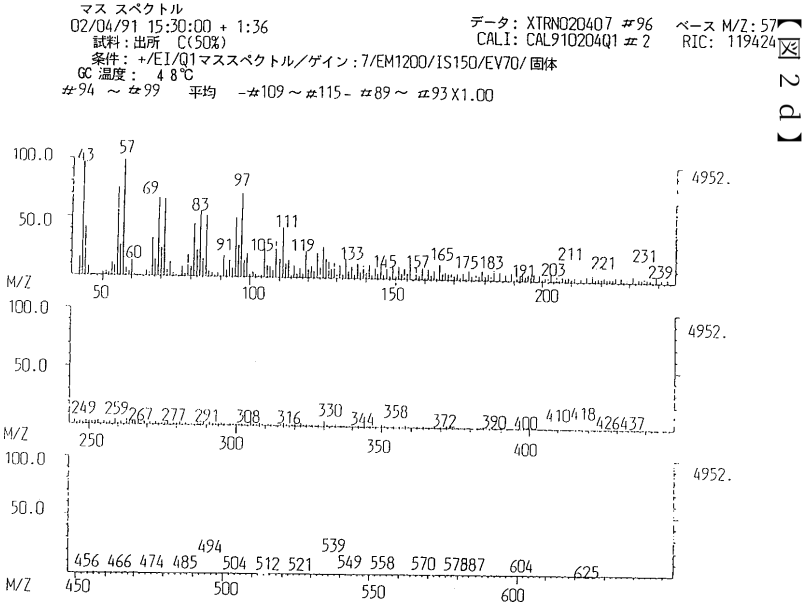

【図２ｂ】



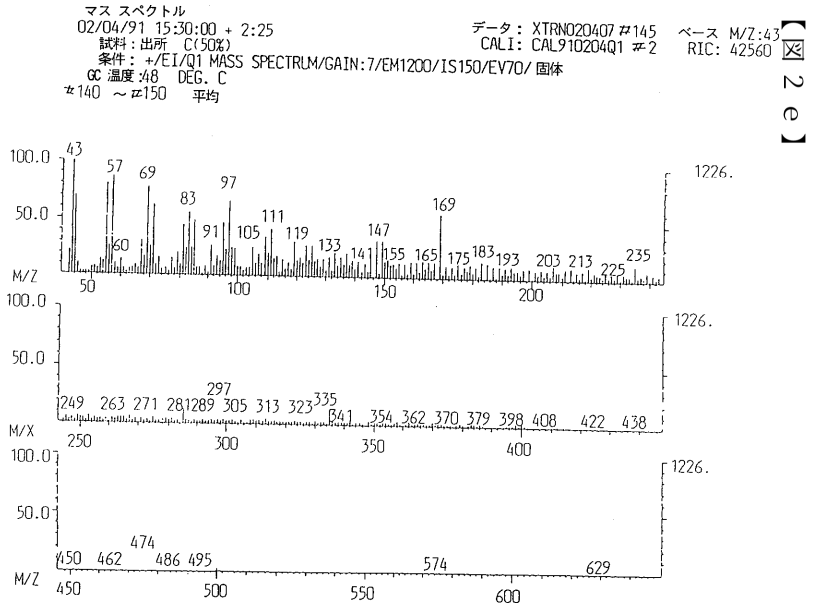
【図２ｃ】



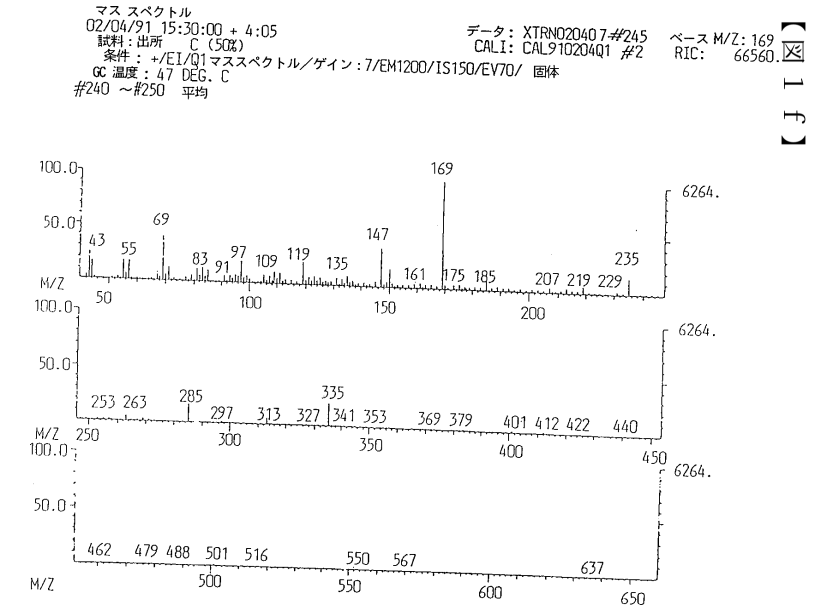

【図２ｄ】



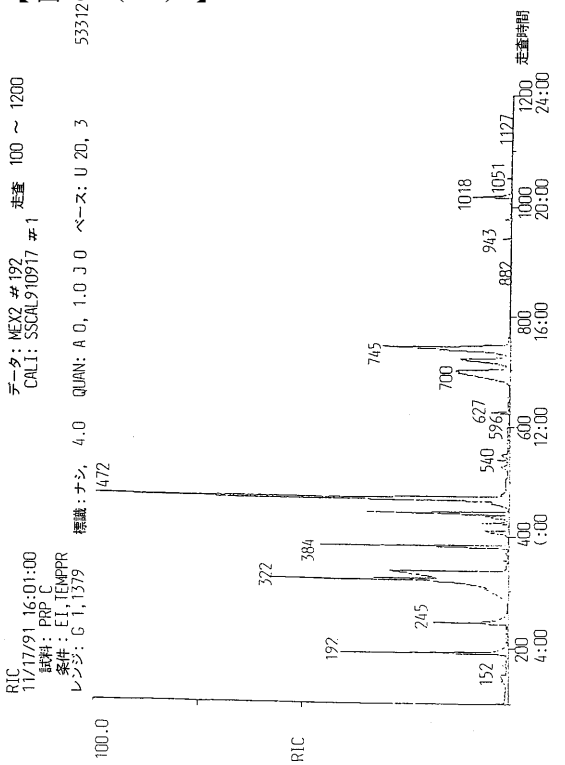

【図２ｅ】



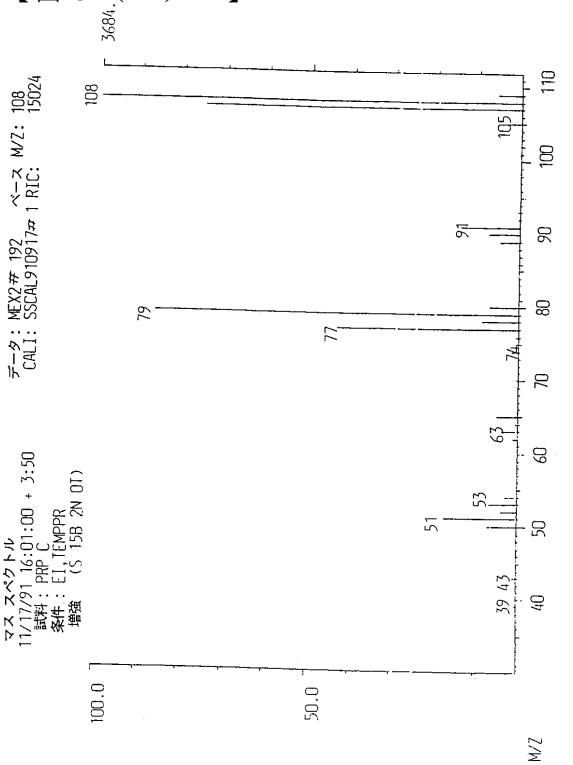

【図１ｆ】



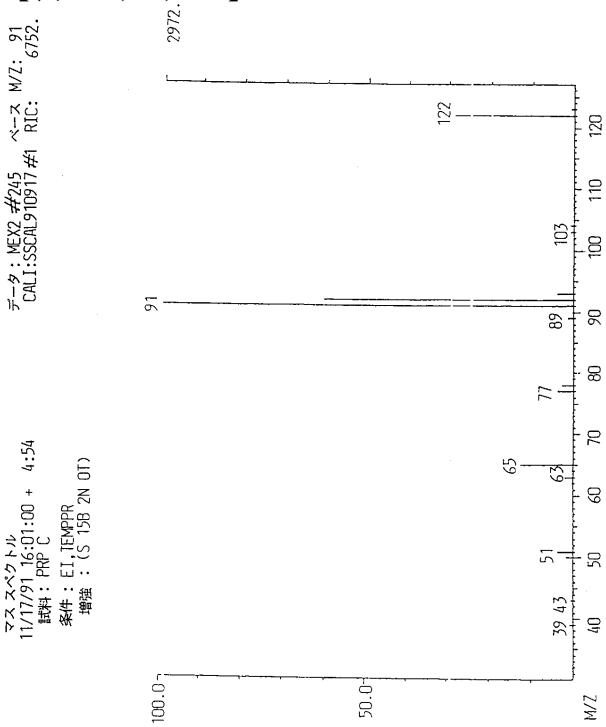
【図３（１）】



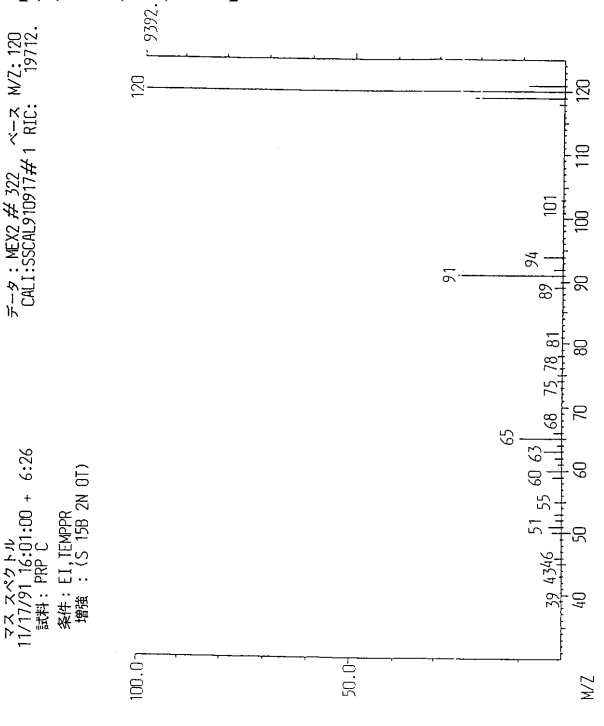

【図３（２）１】



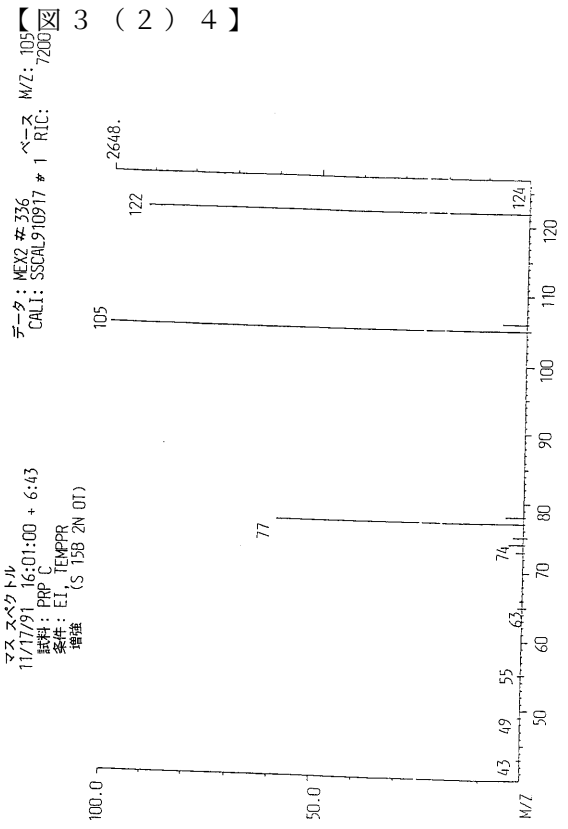

【図３（２）２】



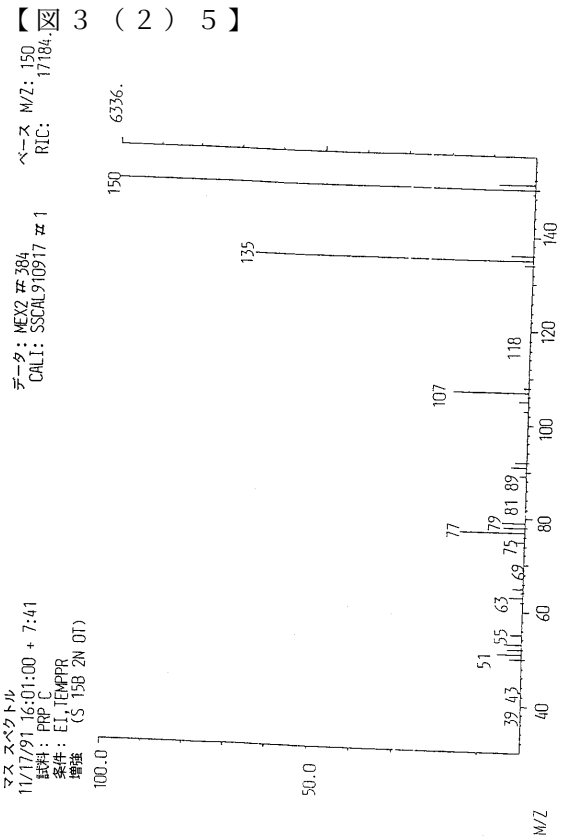

【図３（２）３】



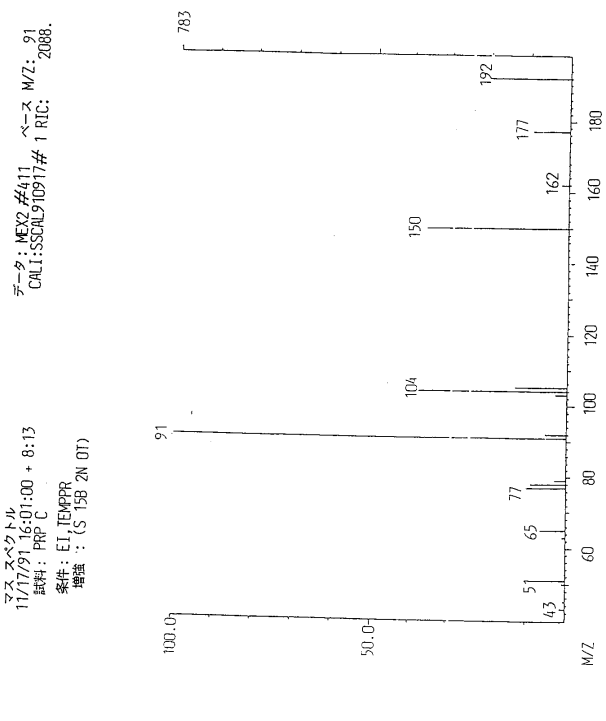
【図３（２）４】



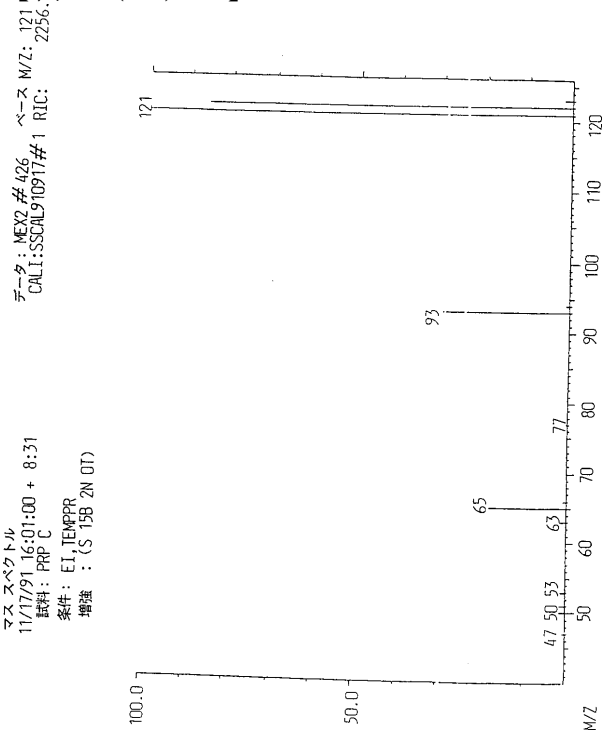

【図３（２）５】



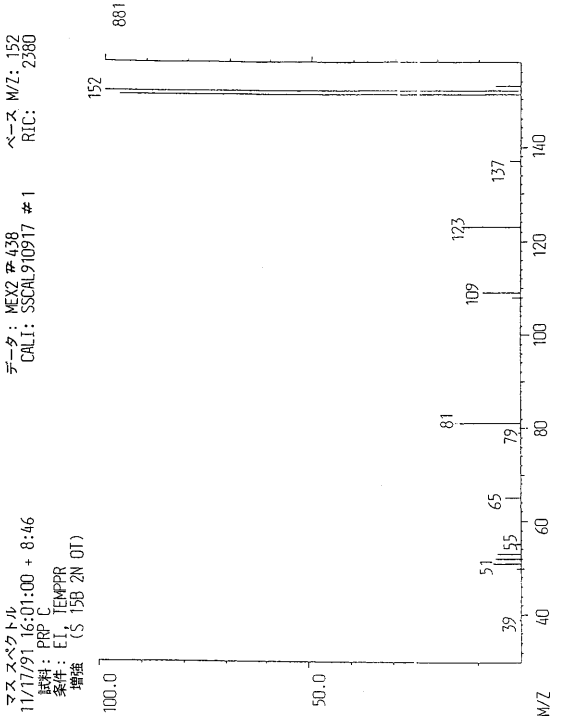

【図３（２）６】



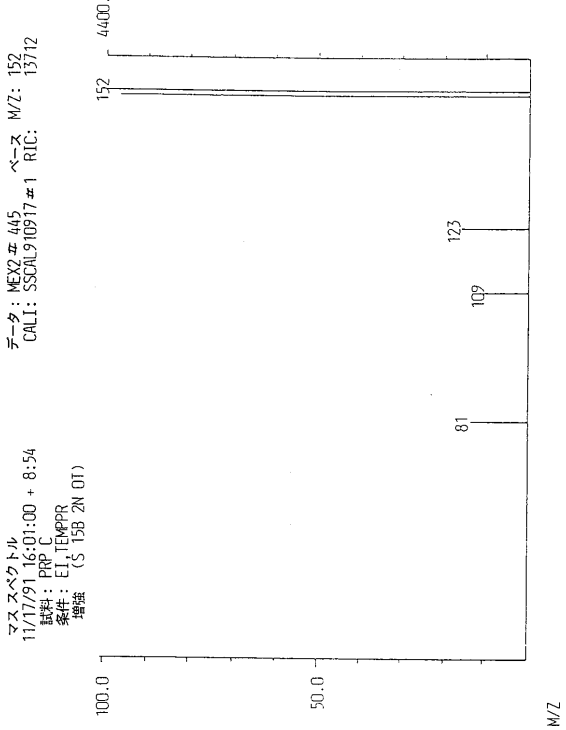

【図３（２）７】



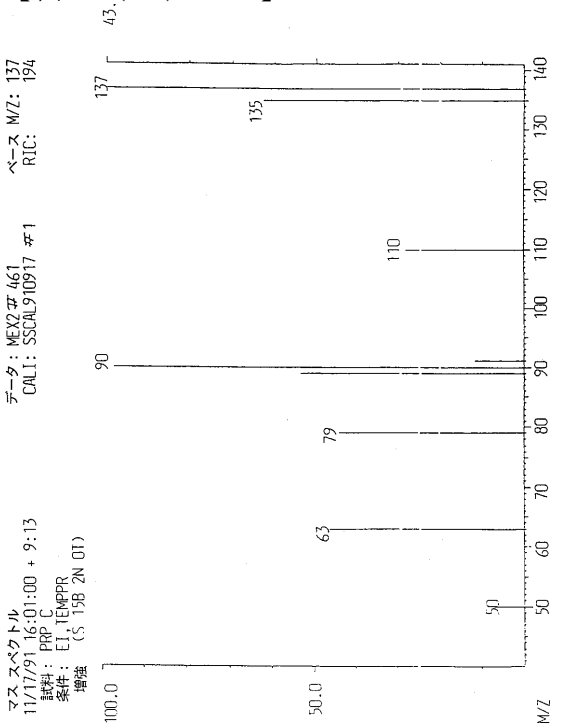
【図３（２）８】



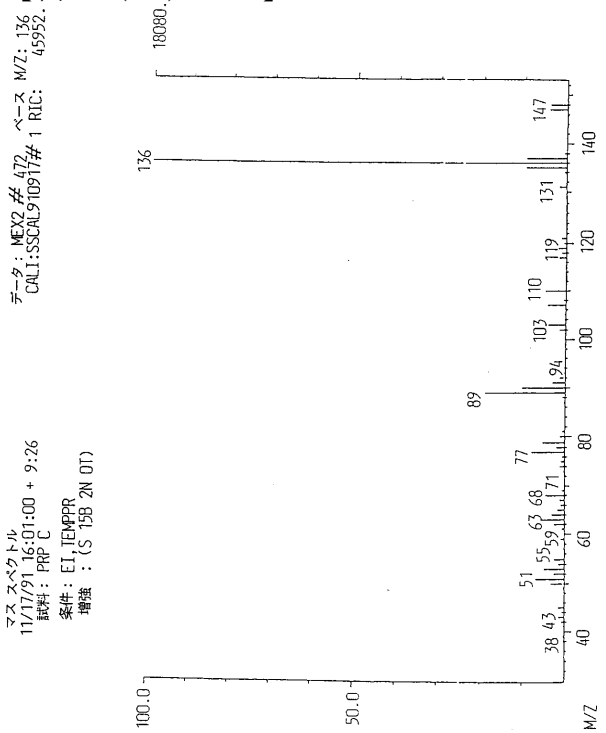

【図３（２）９】



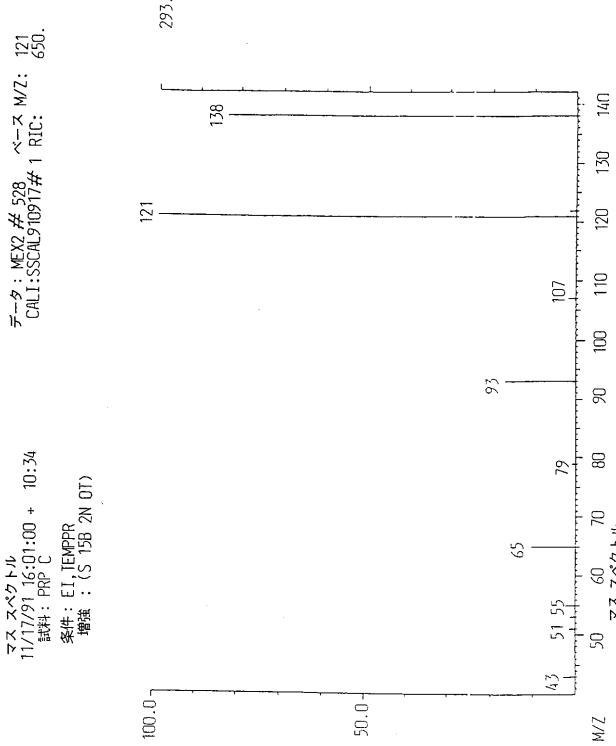

【図３（２）１０】



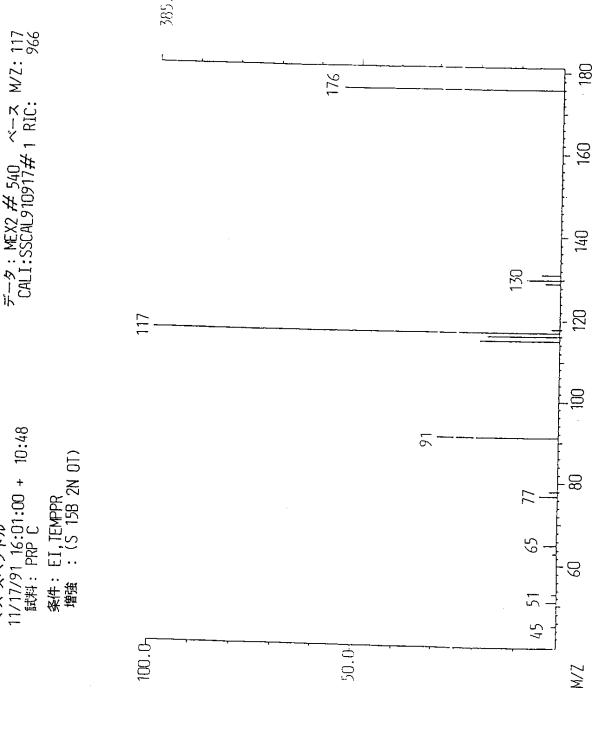

【図３（２）１１】



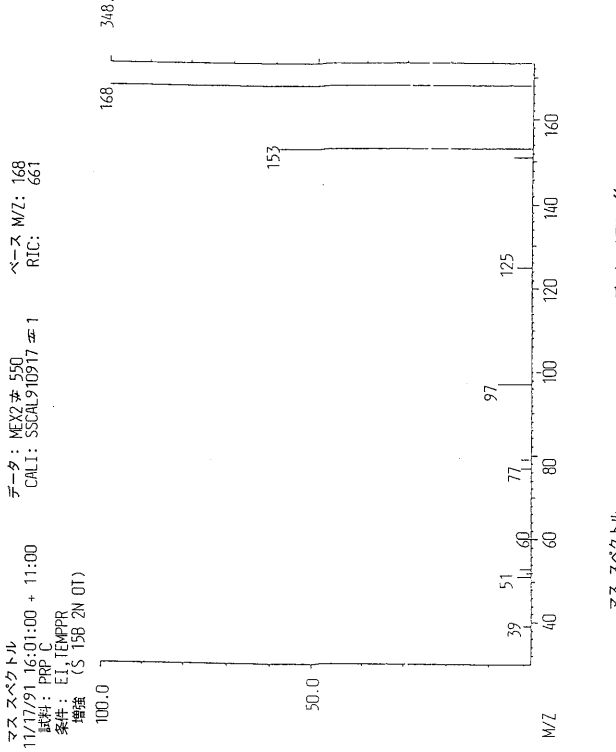
【図３（２）１２】



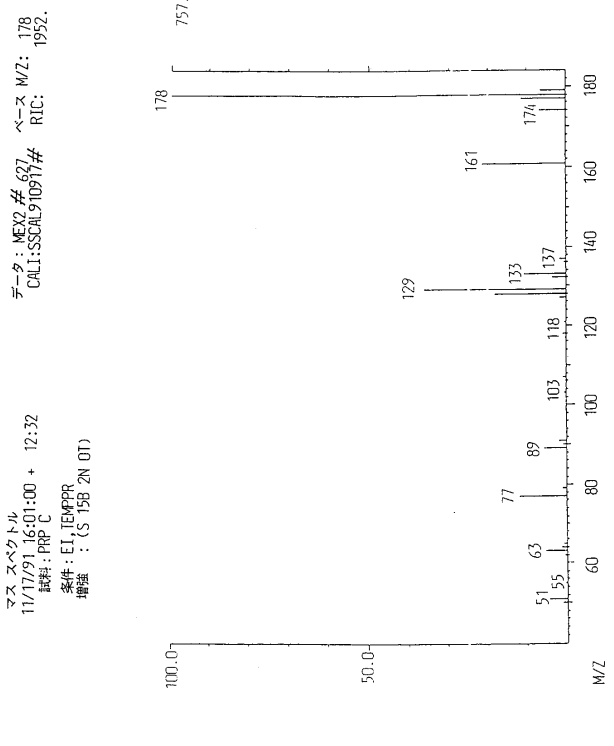

【図３（２）１３】



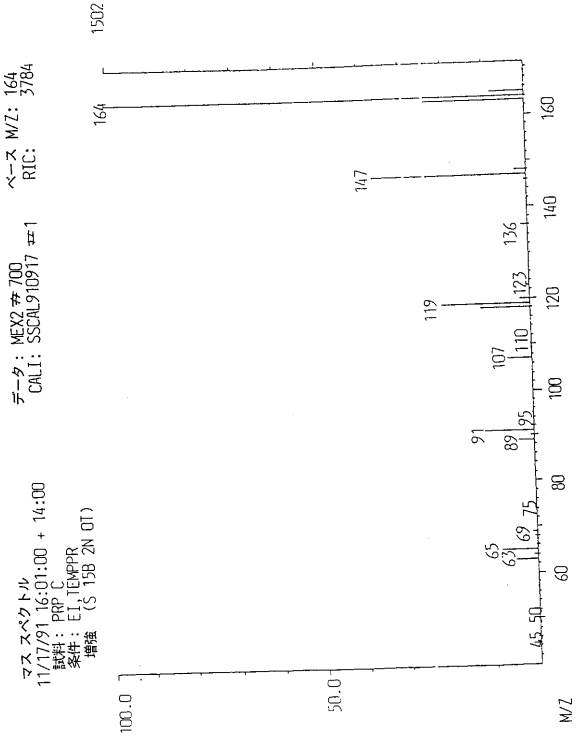

【図３（２）１４】



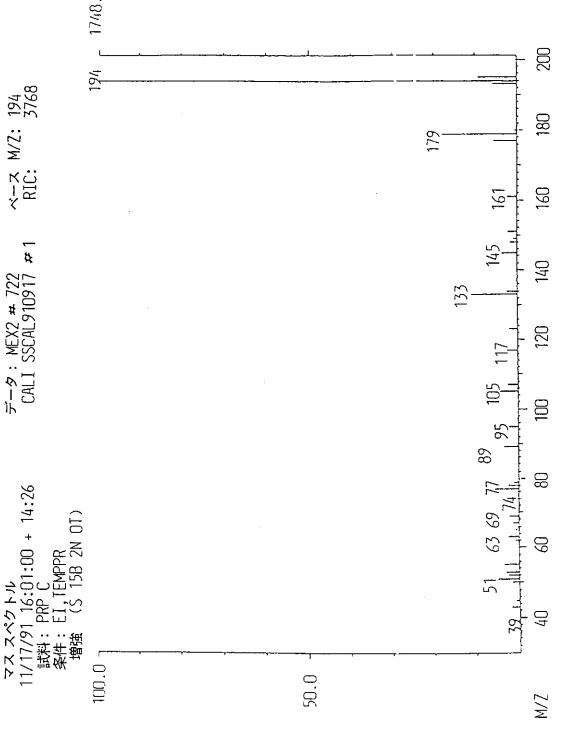

【図３（２）１５】



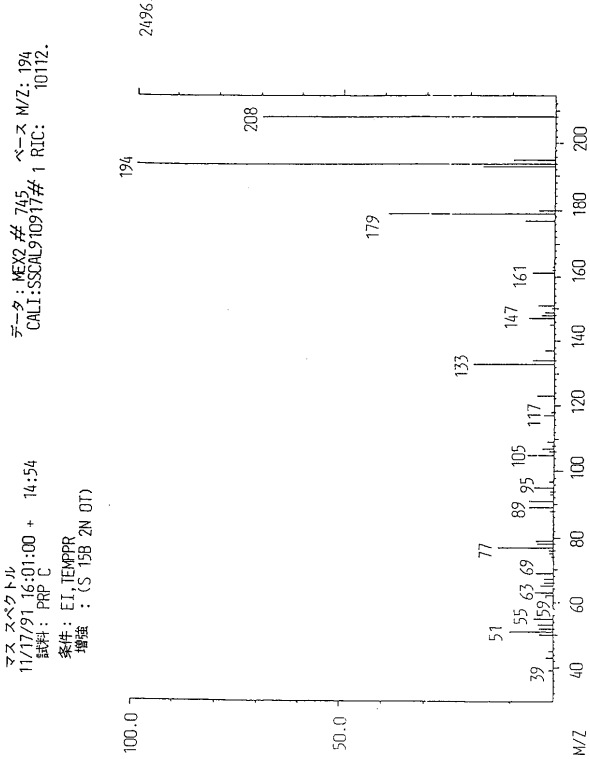
【図３（２）１６】



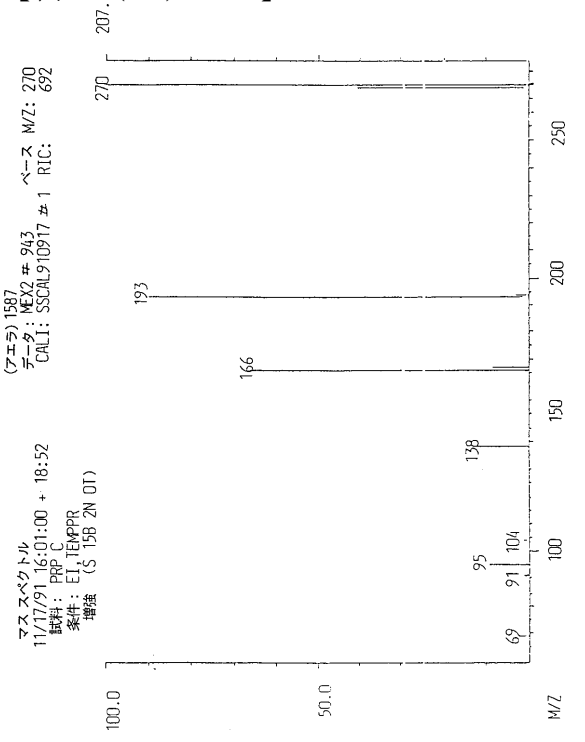

【図３（２）１７】



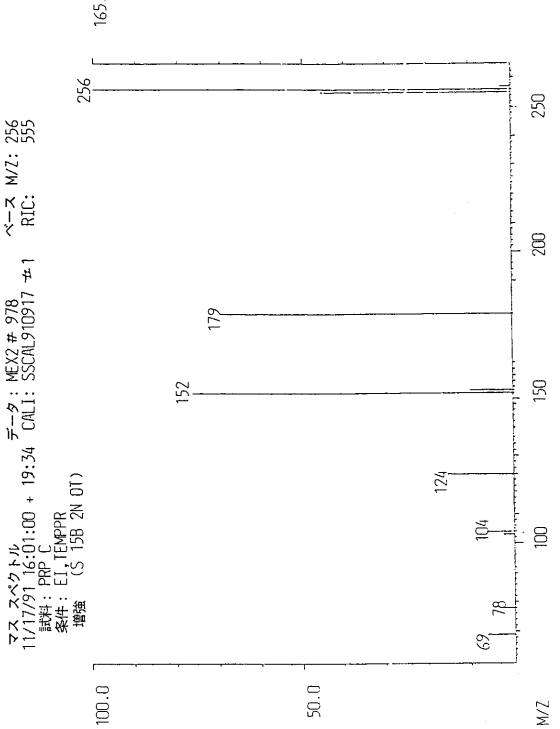

【図３（２）１８】



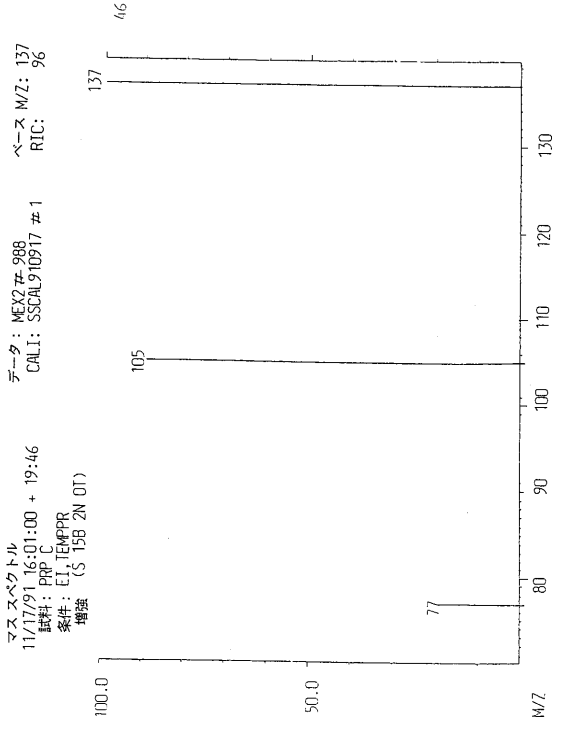

【図３（２）１９】



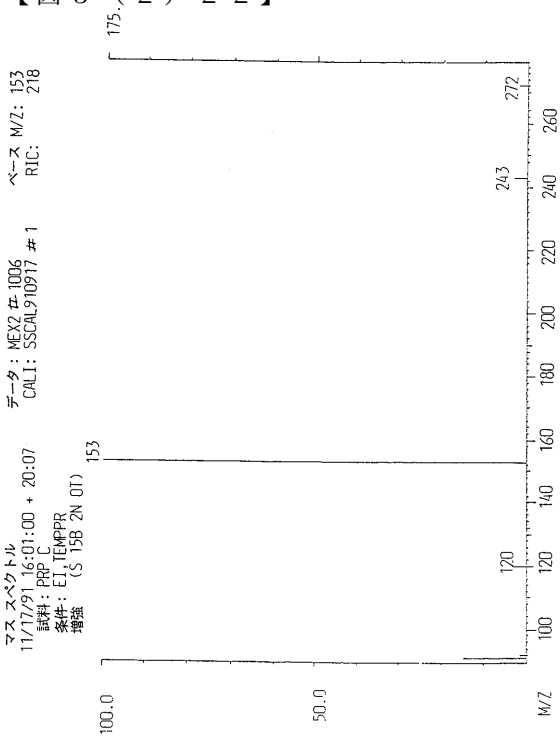
【図３（２）２０】



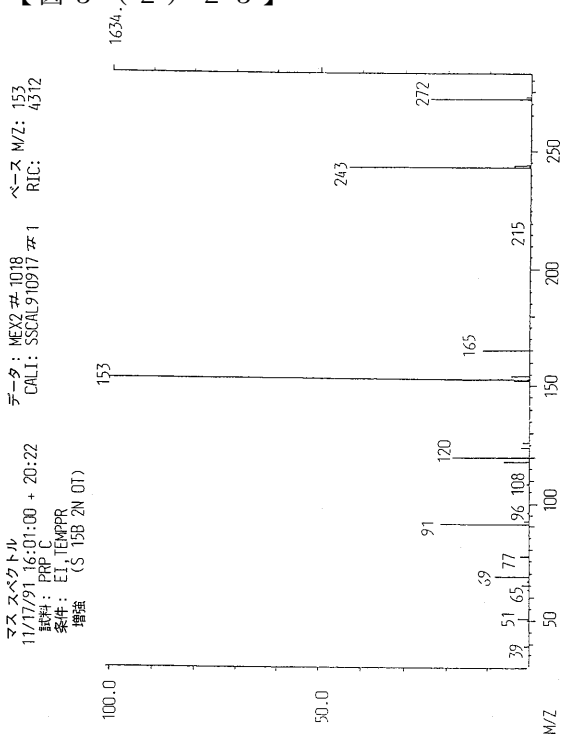

【図３（２）２１】



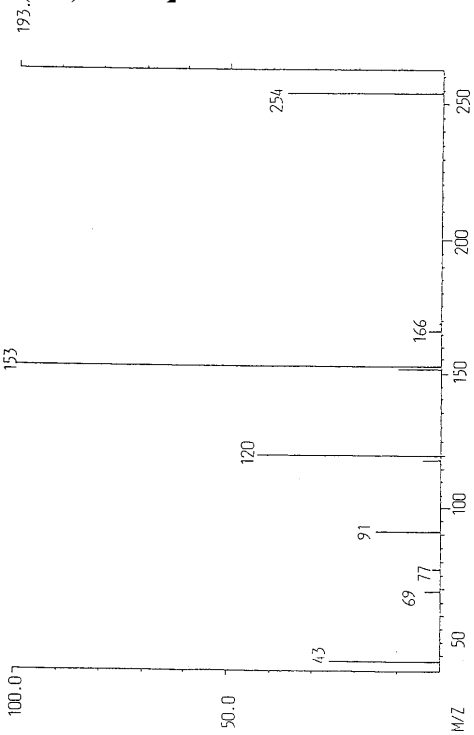

【図３（２）２２】



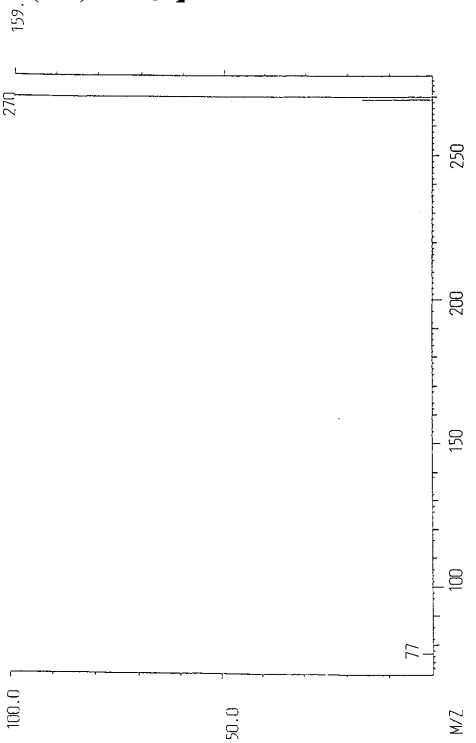

【図３（２）２３】



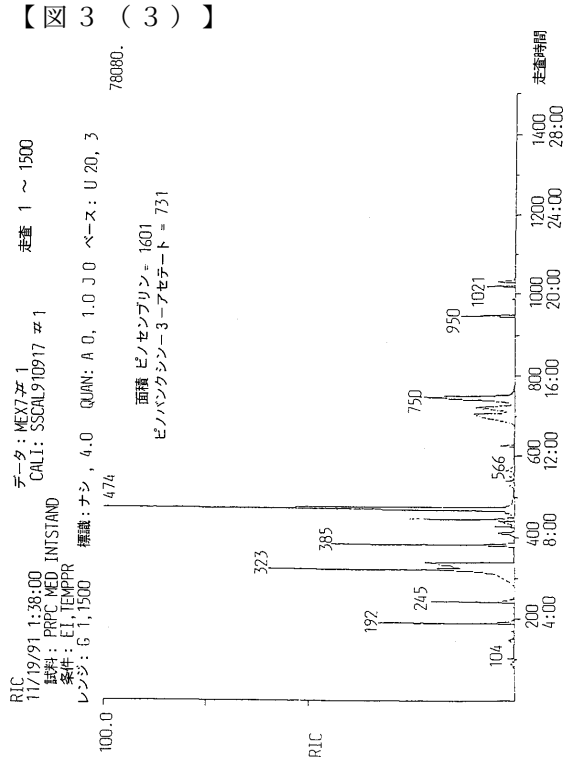
【図３（２）２４】




【図３（２）２５】

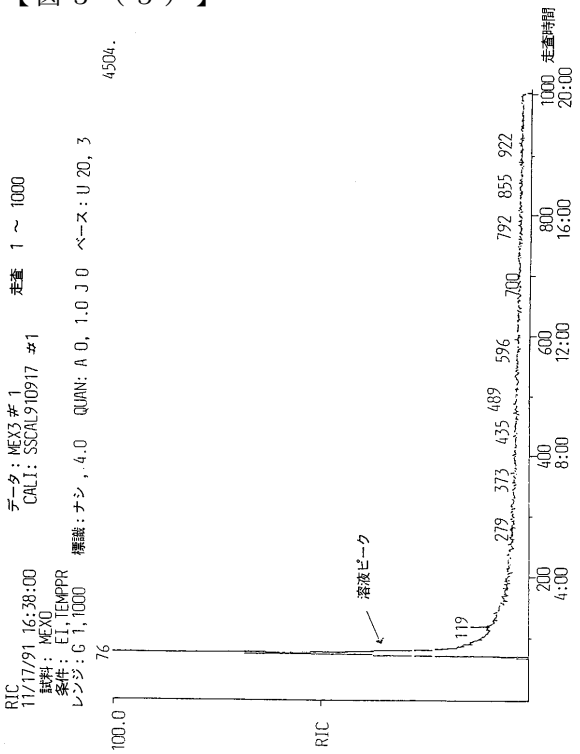



【図３（３）】

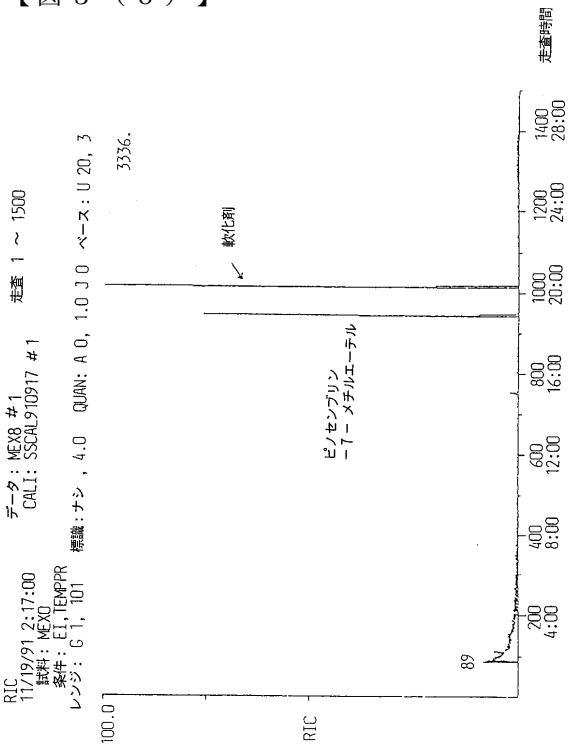



【図３（４）】

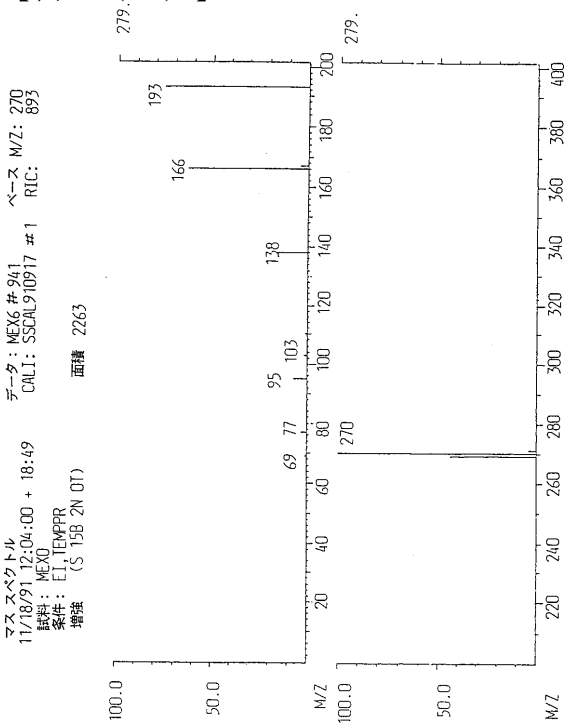
【図３（５）】




【図３（６）】

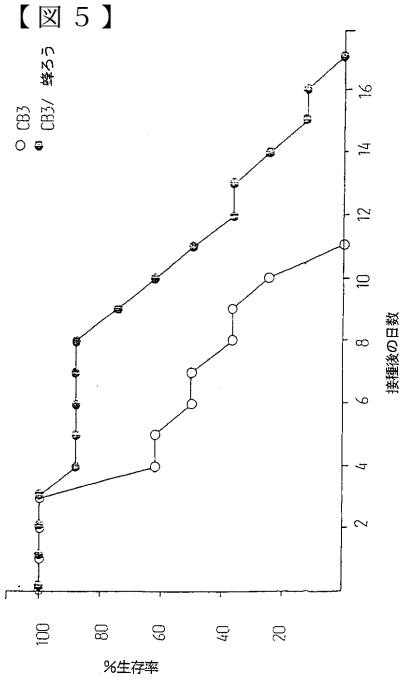



【図３（７）】

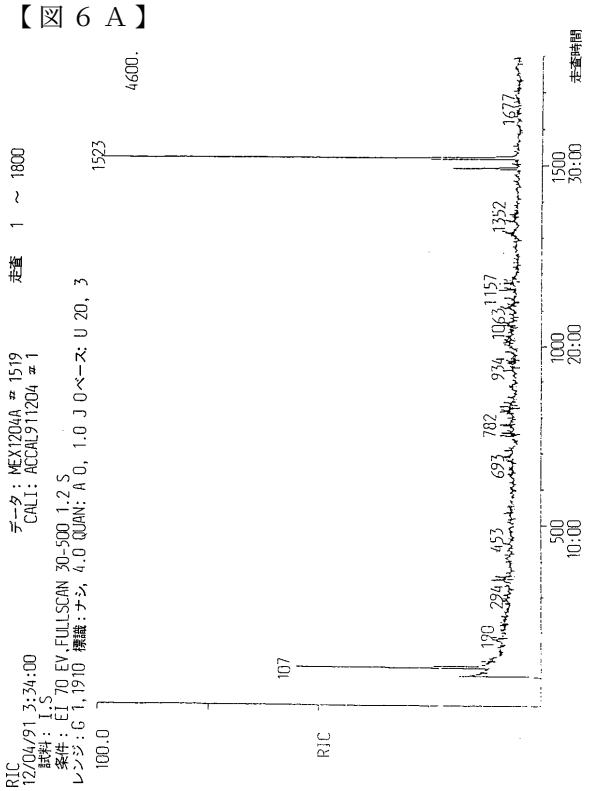



【図４】

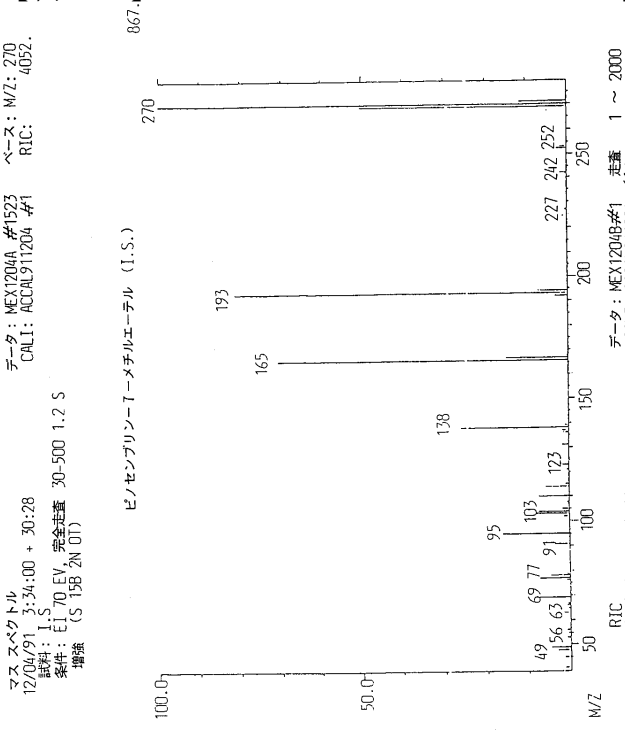
【図５】



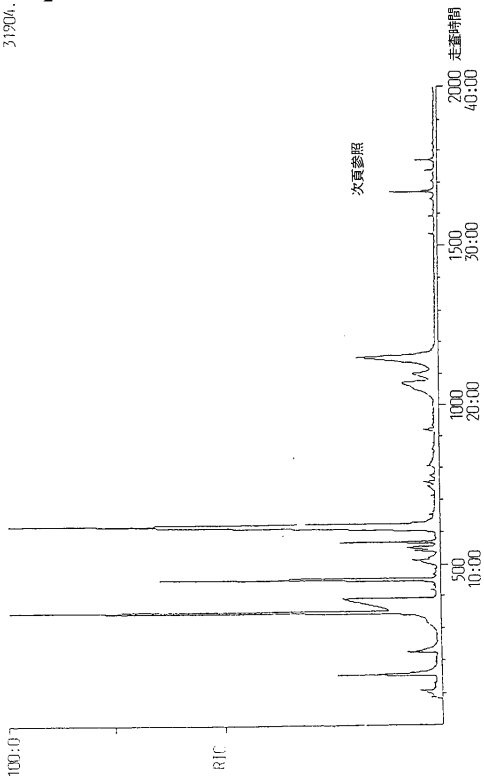

【図６Ａ】



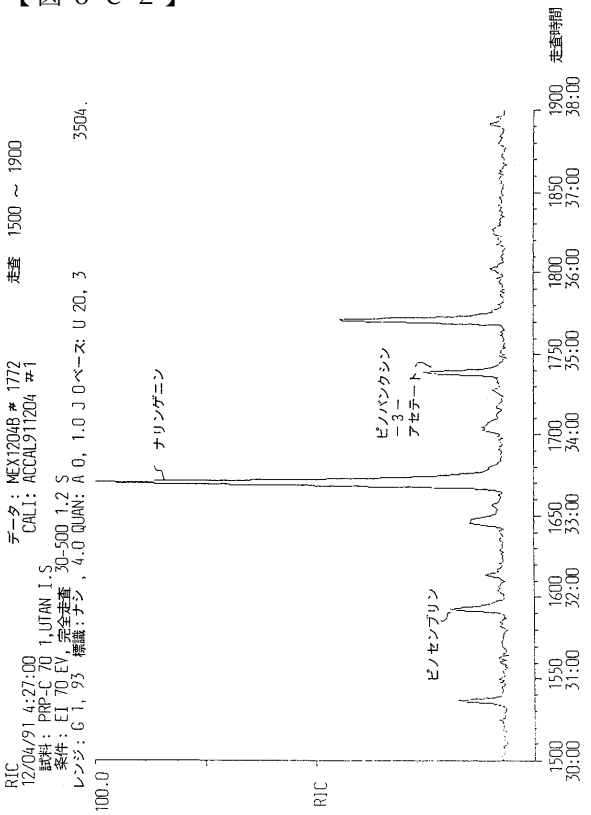

【図６ｂ】



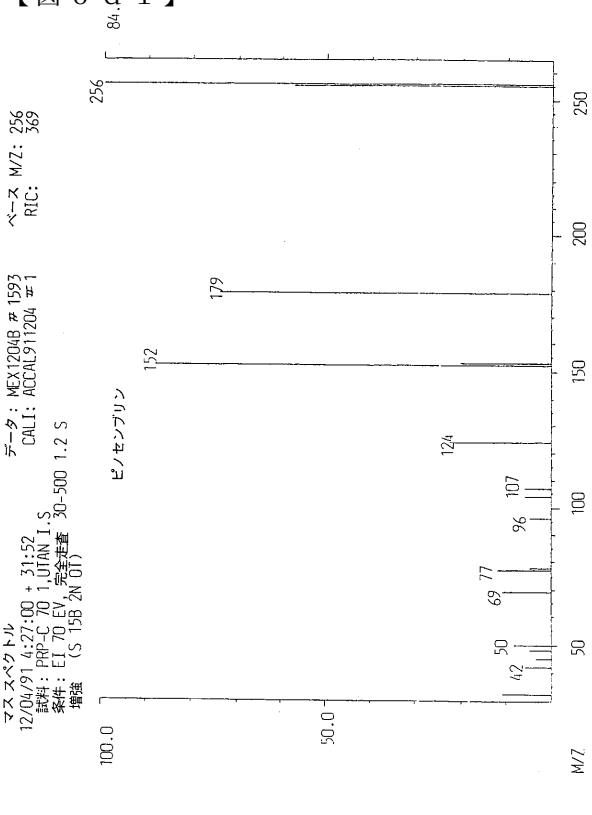

【図６ｃ１】



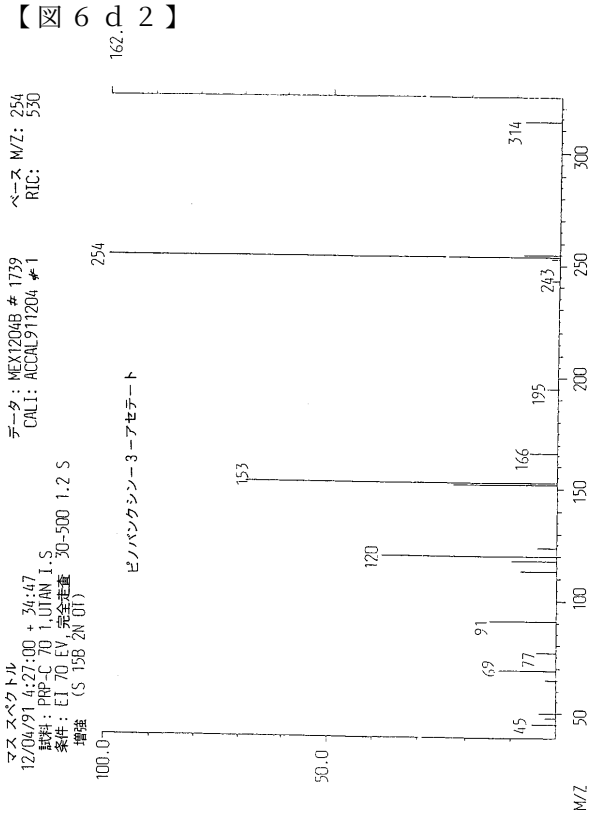
【図６ｃ２】



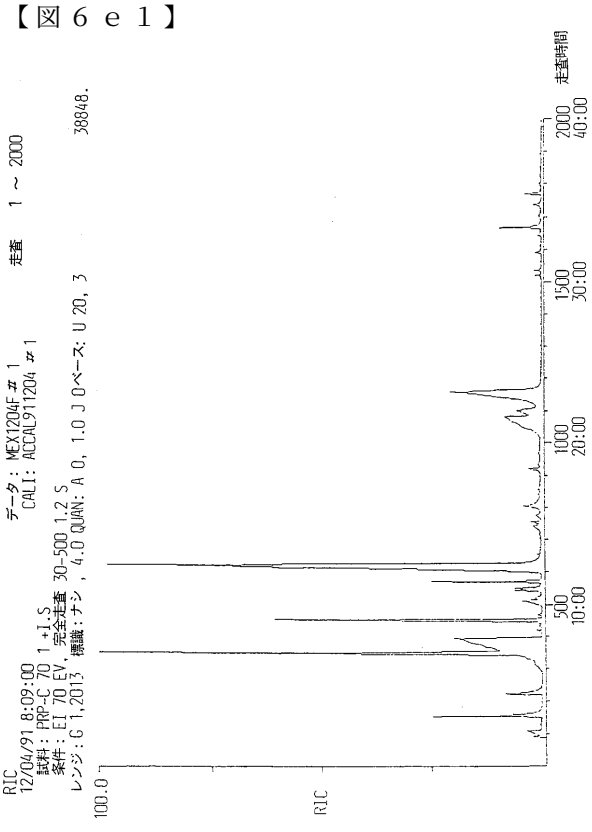

【図６ｄ１】



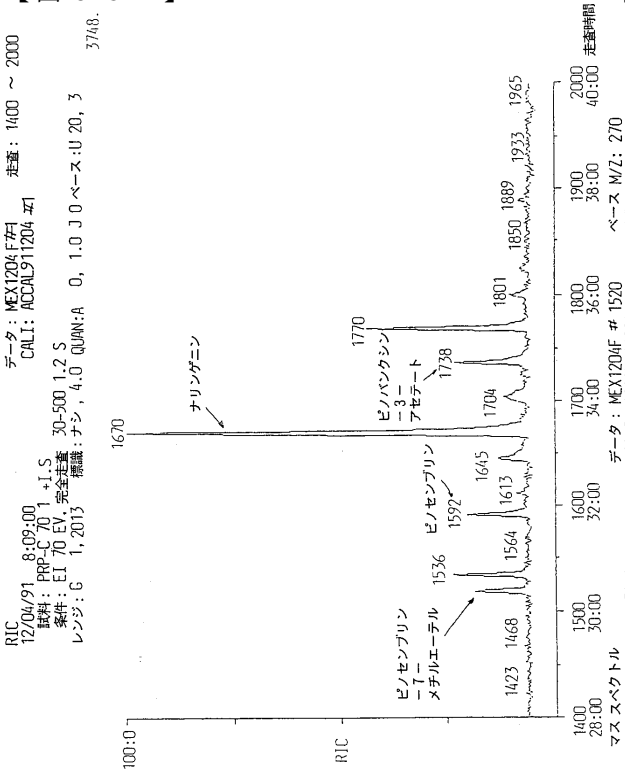

【図６ｄ２】



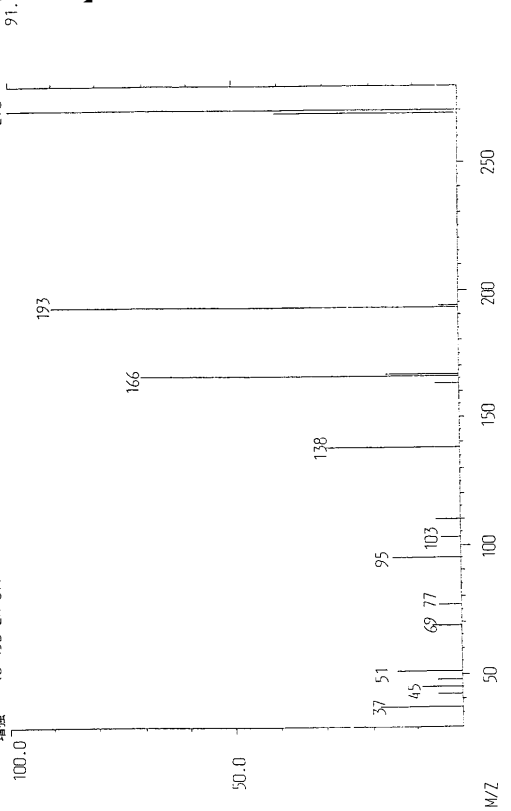

【図６ｅ１】



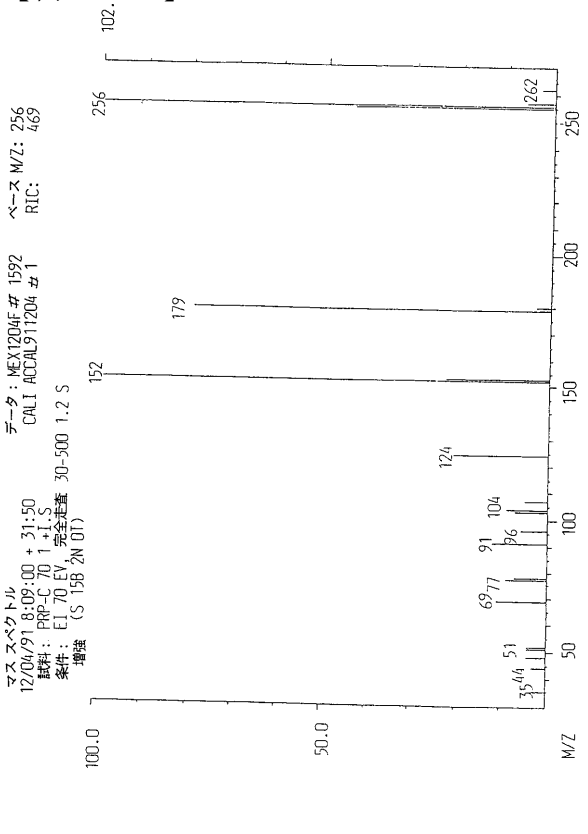
【図６ｅ２】




【図６ｆ１】

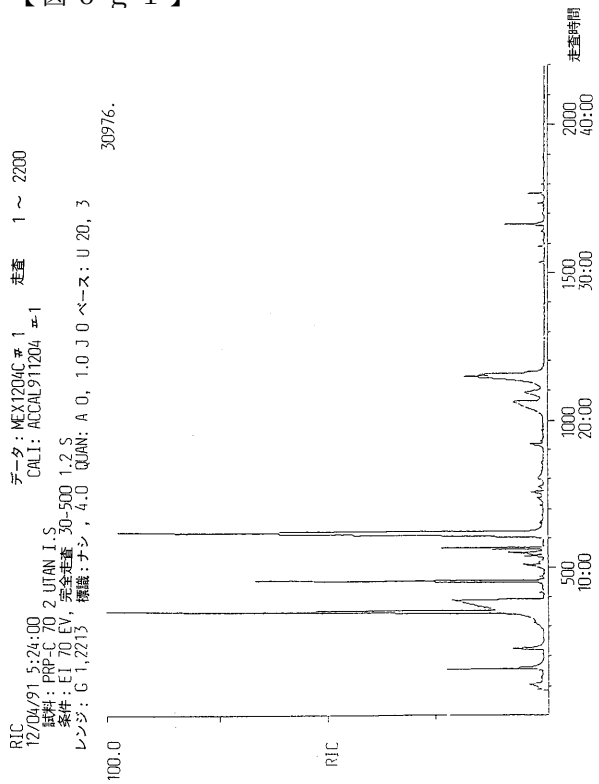



【図６ｆ２】

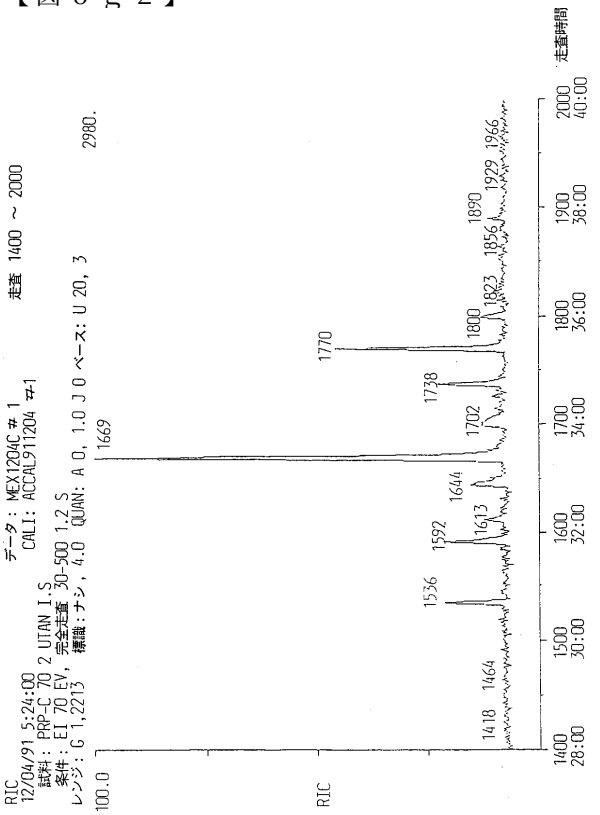



【図６ｆ３】

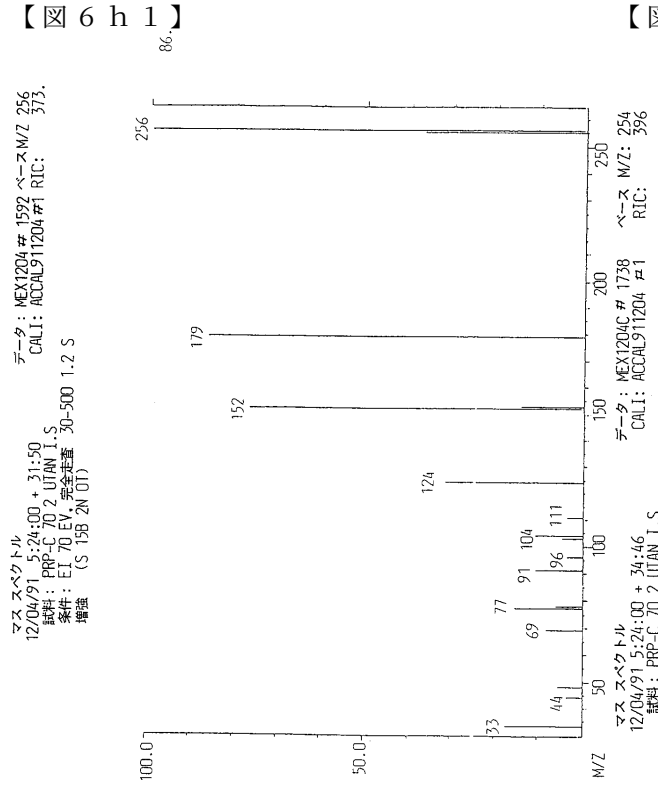
【図６ｇ１】



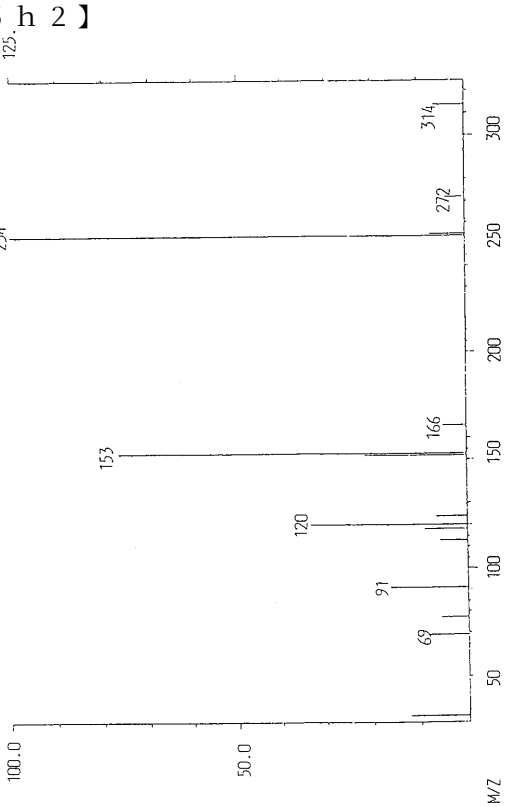

【図６ｇ２】



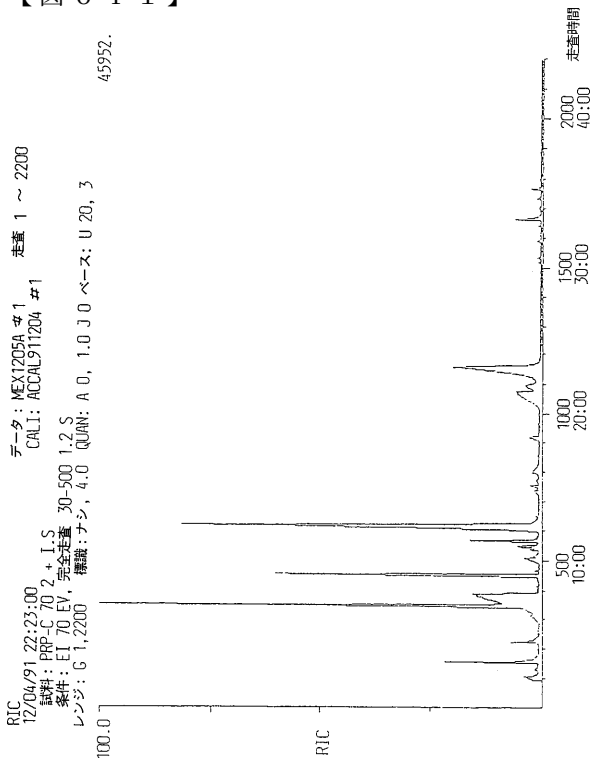

【図６ｈ１】



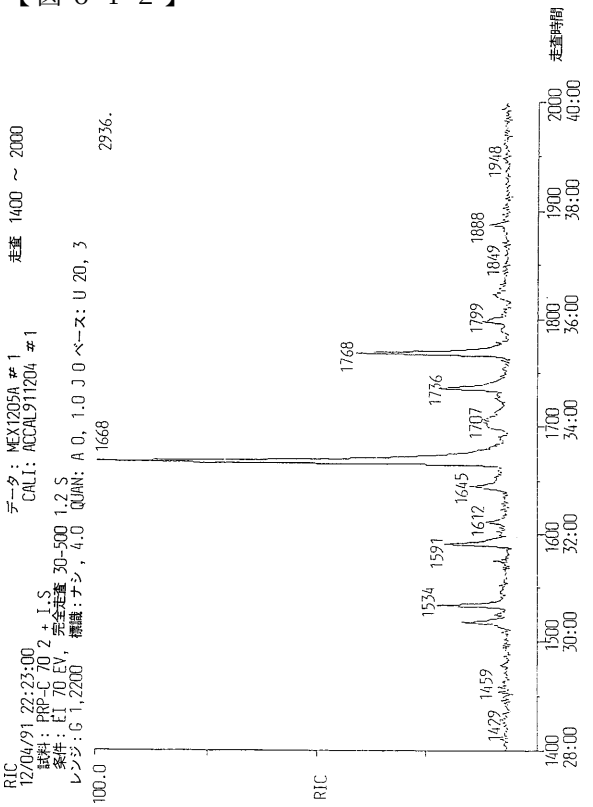

【図６ｈ２】



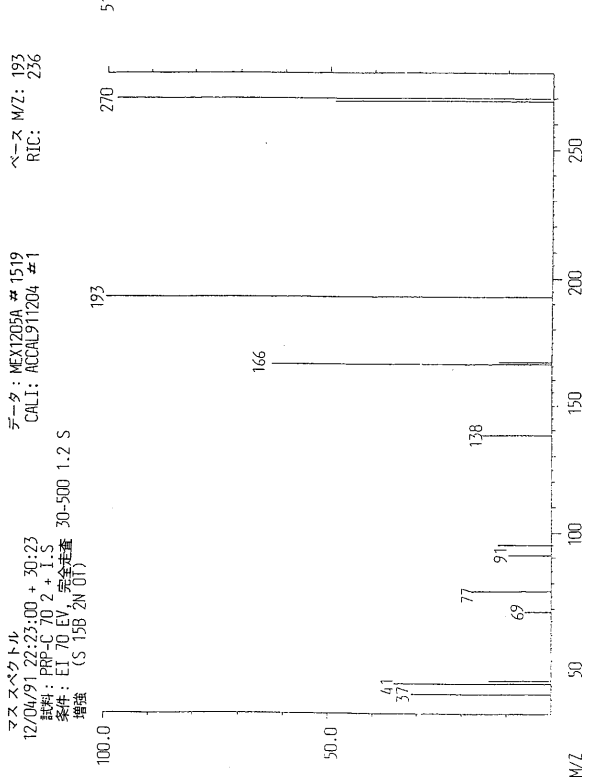
【図６ｉ１】



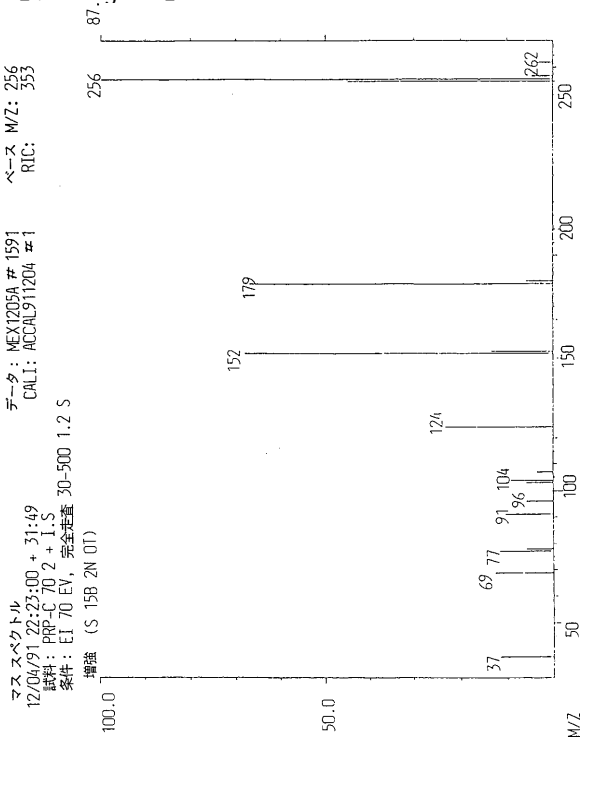

【図６ｉ２】



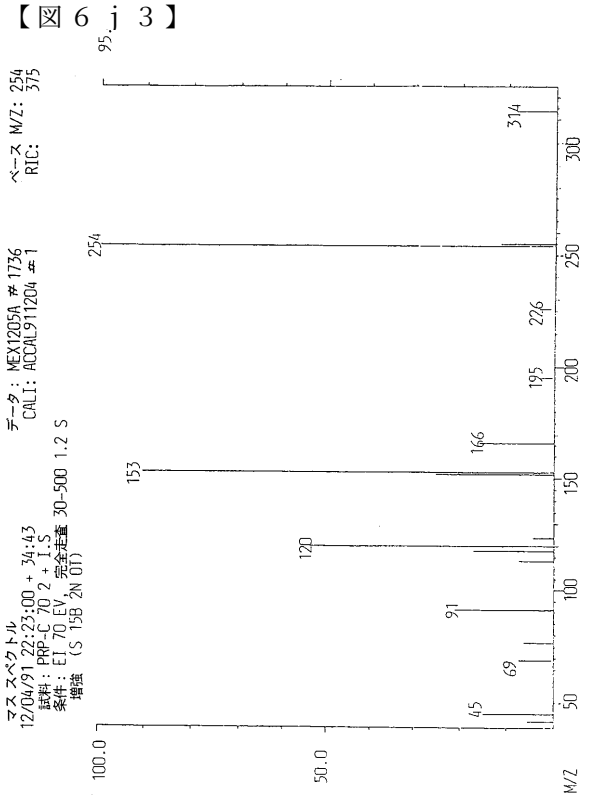

【図６ｊ１】



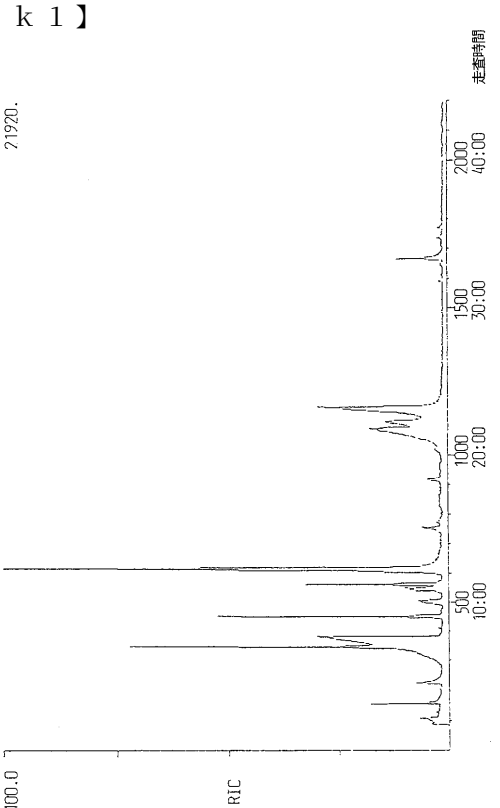

【図６ｊ２】



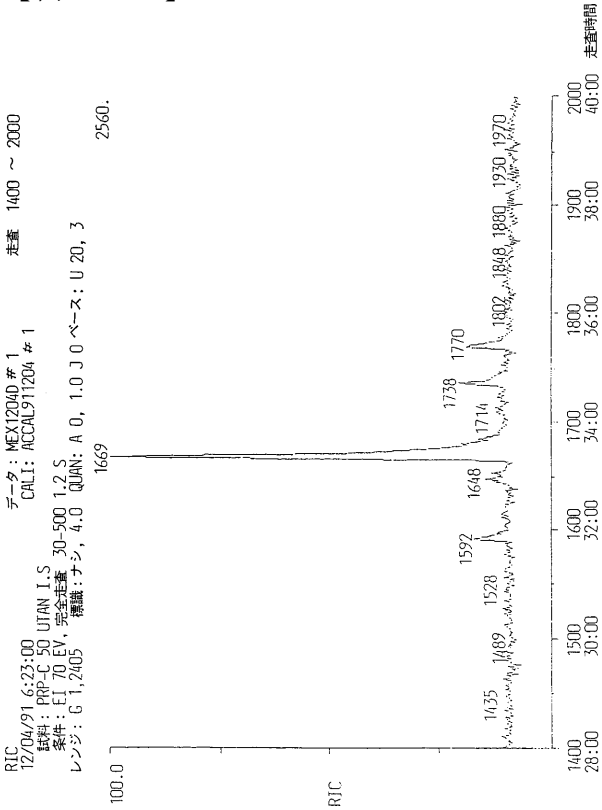
【図６ｊ３】



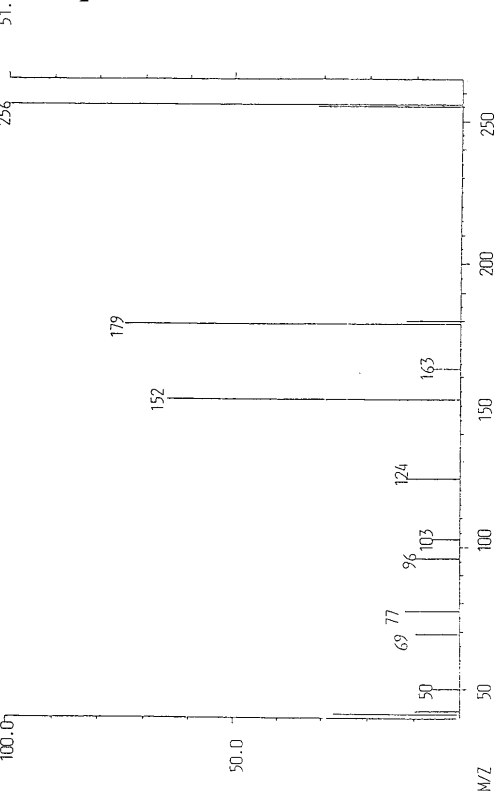

【図６ｋ１】



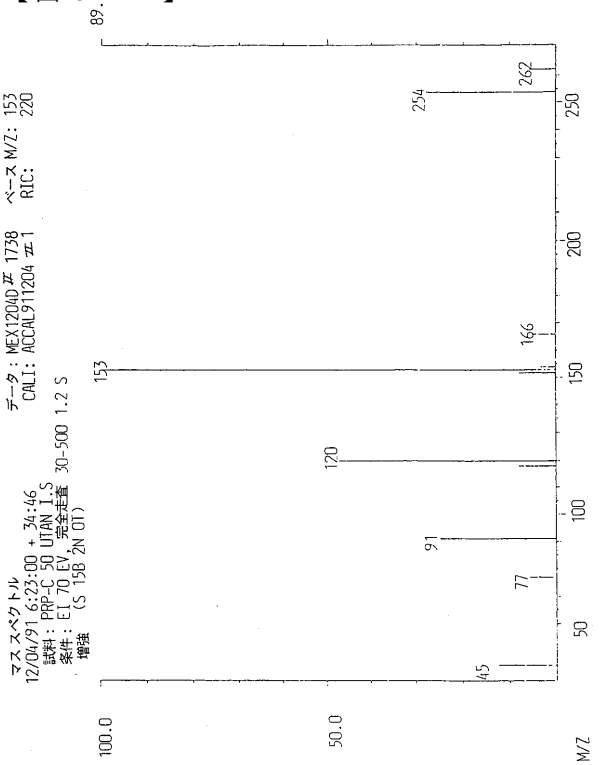

【図６ｋ２】



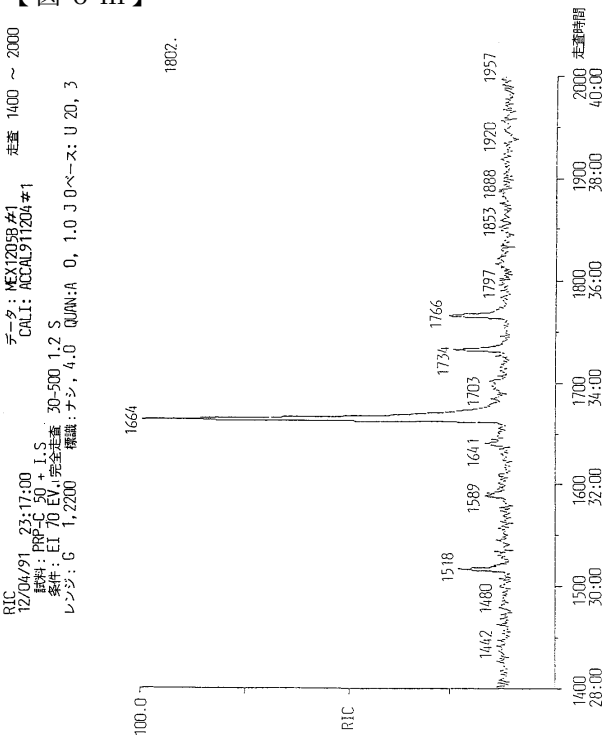

【図６ｌ１】



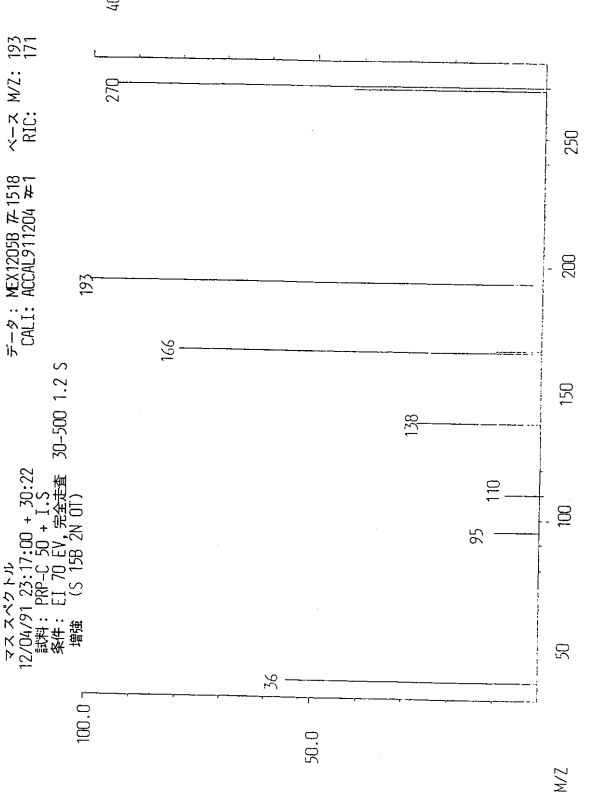
【図６１２】



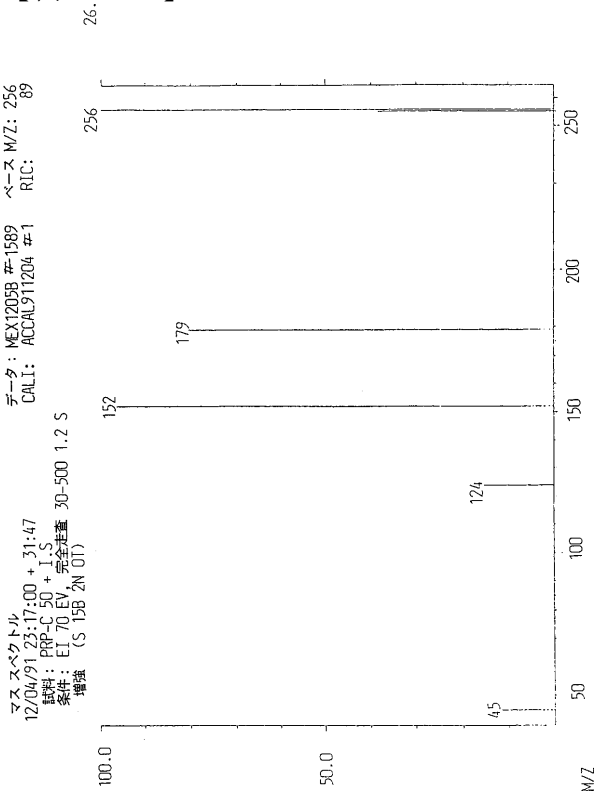

【図６ｍ】



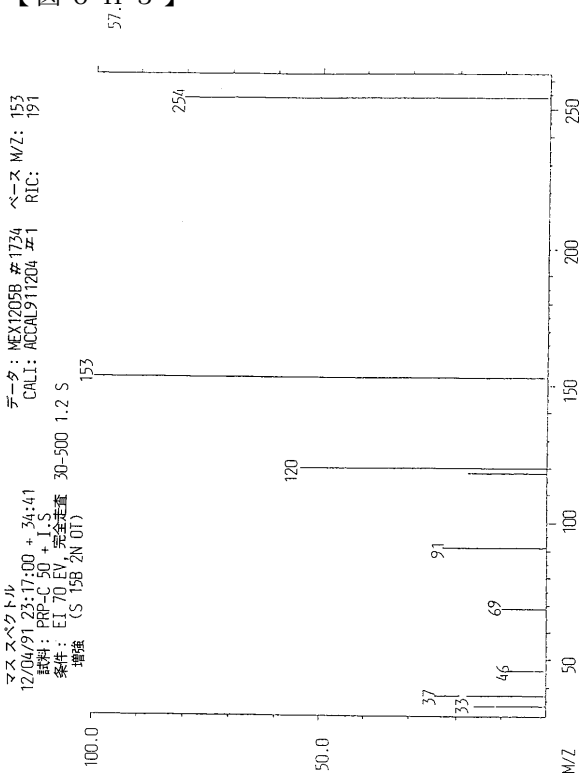

【図６ｎ１】



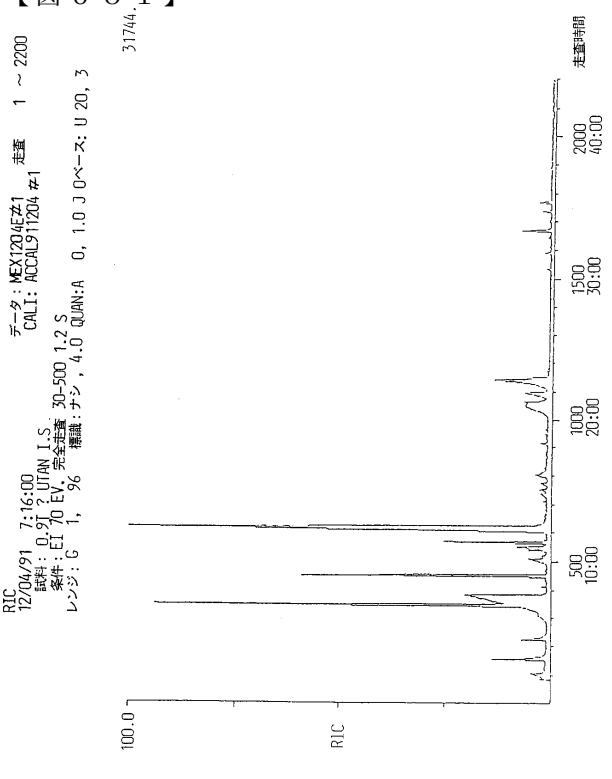

【図６ｎ２】



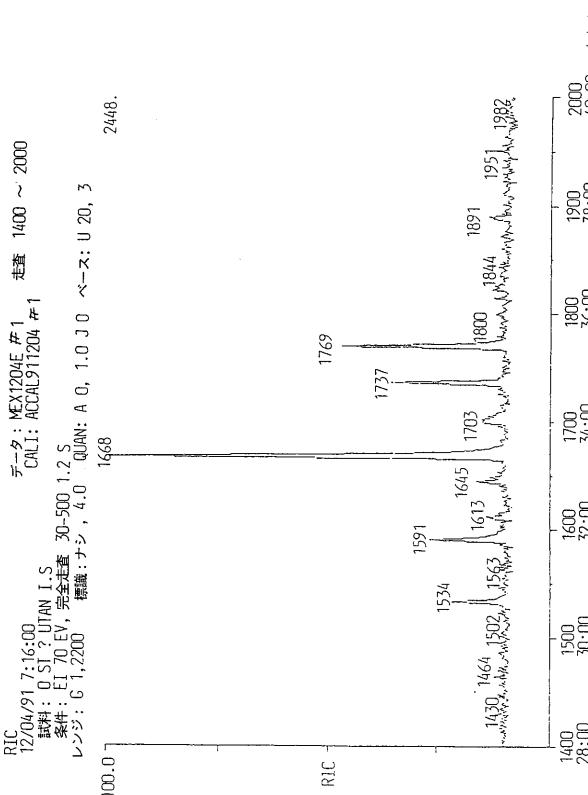
【図６ｎ３】



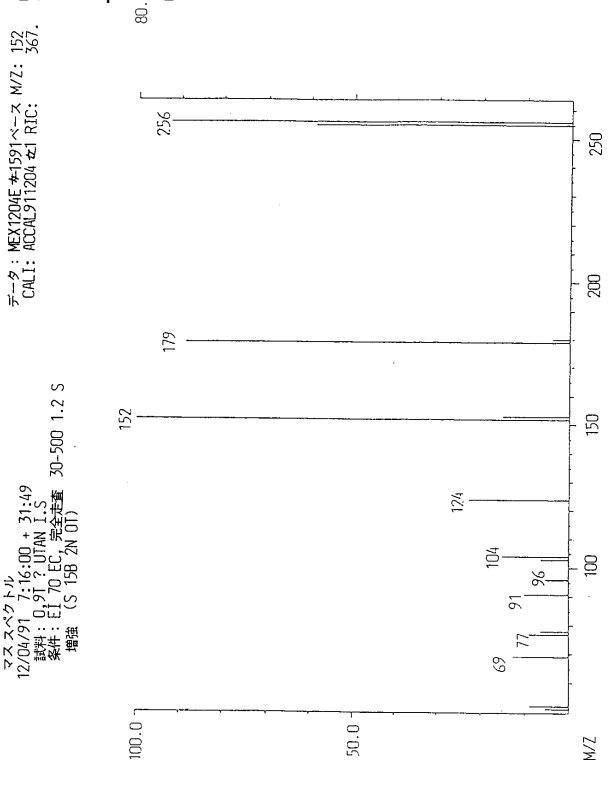

【図６ｏ１】



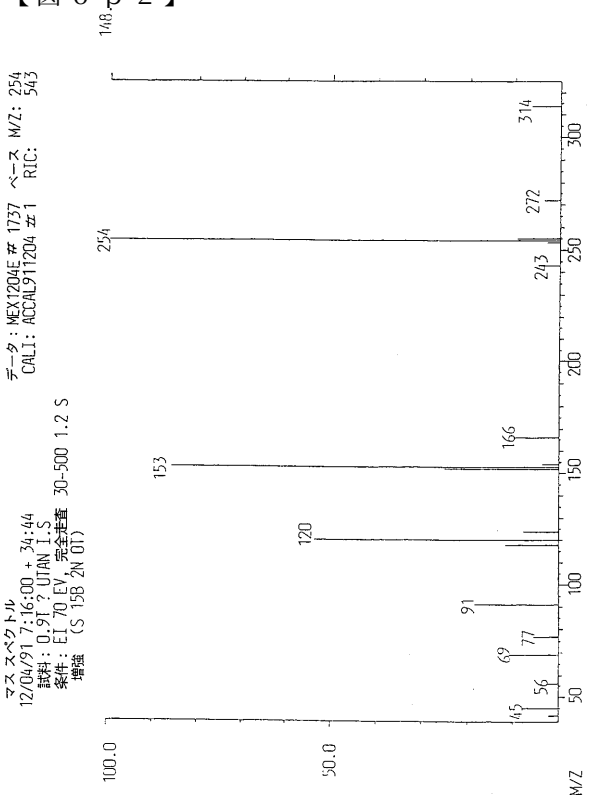

【図６ｏ２】



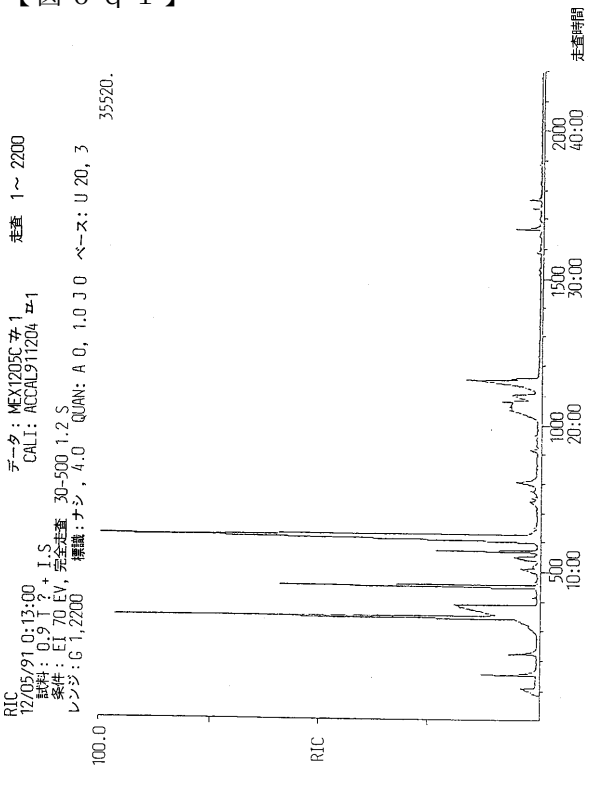

【図６ｐ１】



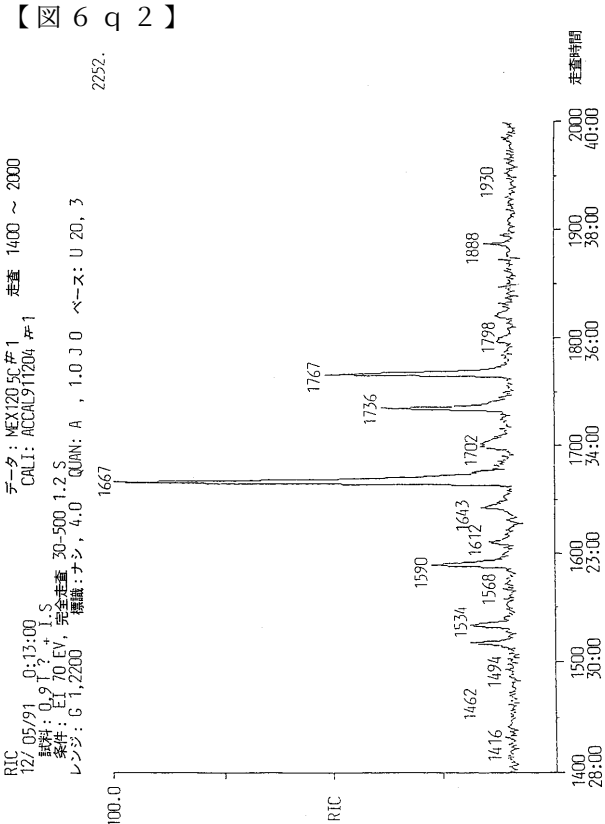
【図６ｐ２】



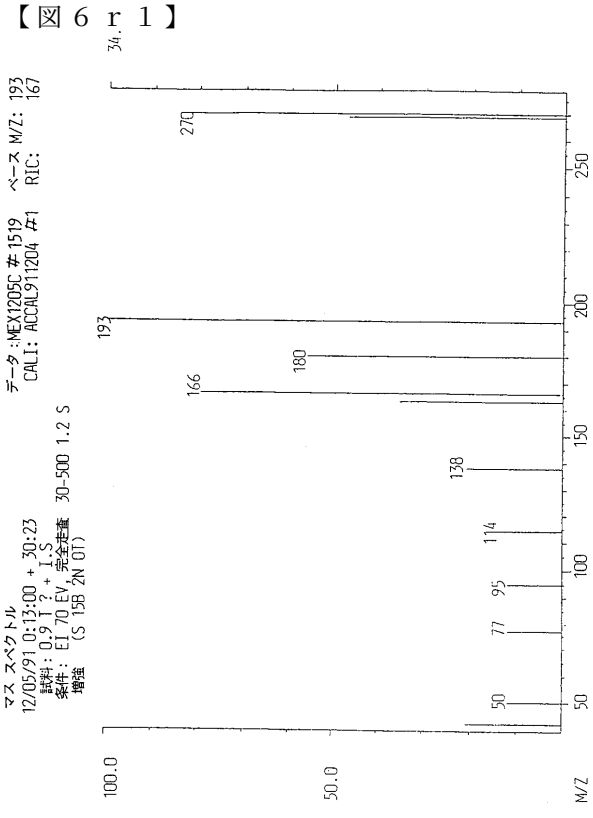

【図６ｑ１】



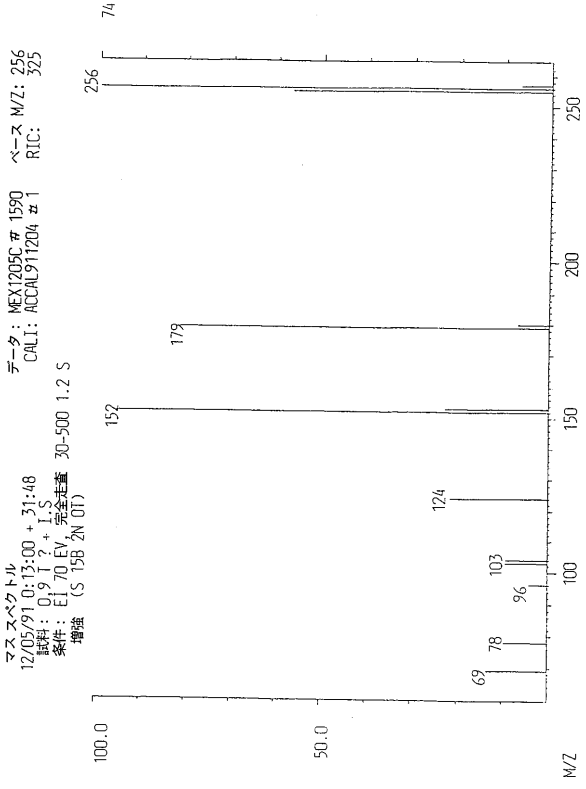

【図６ｑ２】



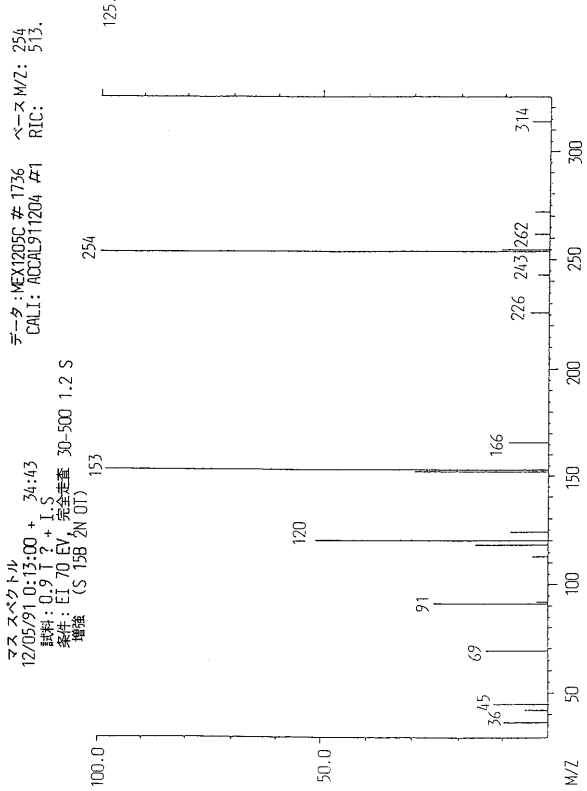

【図６ｒ１】



【図６ｒ２】


データ： MEX1205C # 1590 ベース M/Z: 256
CAL1: ACCAL911204 #1 RIC: 325
マス スペクトル
12/05/91 0:13:00 + 31:48
試料： 0.9 T ? + I.S
条件： EI 70 EV, 完全走査 30-500 1.2 S
増強 (S 15B 2N OT)
74.
256
179
152
124
103
96
78
69
100.0
50.0
M/Z
250
200
150
100

【図６ｒ３】


データ :MEX1205C # 1736 ベース M/Z: 254
CAL1: ACCAL911204 #1 RIC: 513.
マス スペクトル
12/05/91 0:13:00 + 34:43
試料： 0.9 T ? + I.S
条件： EI 70 EV, 完全走査 30-500 1.2 S
増強 (S 15B 2N OT)
125.
254
153
120
91
69
45
36
166
226
243
262
314
100.0
50.0
M/Z
300
250
200
150
100
50

フロントページの続き

(74)代理人 100096194
弁理士 竹内 英人
(74)代理人 100074228
弁理士 今城 俊夫
(74)代理人 100084009
弁理士 小川 信夫
(74)代理人 100082821
弁理士 村社 厚夫
(74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治
(72)発明者 マルコニウス マリア
スウェーデン エス－１２１７４ ヨハネスホフ ビエルフスヴェーイェン １３９

合議体
審判長 竹林 則幸
審判官 谷口 博
審判官 深津 弘

(56)参考文献 特開平2－１１１７２５号公報
Ｐｈａｒｍａｚｉｅ，３４（２），９７－１０２（１９７９）
Ｌｅｂｅｎｓｍ．－Ｗｉｓｓ．Ｔｅｃｈｎｏｌ．１７（２），７４－７６（１９８４）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｄ３１１／３２，Ａ６１Ｋ３１／３５