

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5383692号  
(P5383692)

(45) 発行日 平成26年1月8日(2014.1.8)

(24) 登録日 平成25年10月11日(2013.10.11)

(51) Int. Cl.	F I
<b>C 0 7 H 15/04 (2006.01)</b>	C O 7 H 15/04 A
<b>A 6 1 K 31/7028 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7028
<b>A 6 1 P 1/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/04
<b>A 6 1 P 31/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/04
<b>A 2 3 L 1/30 (2006.01)</b>	A 2 3 L 1/30 Z

請求項の数 3 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2010-532975 (P2010-532975)  
 (86) (22) 出願日 平成21年10月9日(2009.10.9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2009/067657  
 (87) 国際公開番号 W02010/041746  
 (87) 国際公開日 平成22年4月15日(2010.4.15)  
 審査請求日 平成23年4月7日(2011.4.7)  
 (31) 優先権主張番号 特願2008-263880 (P2008-263880)  
 (32) 優先日 平成20年10月10日(2008.10.10)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000173924  
 公益財団法人野口研究所  
 東京都板橋区加賀1-8-1  
 (74) 代理人 100088306  
 弁理士 小宮 良雄  
 (74) 代理人 100126343  
 弁理士 大西 浩之  
 (72) 発明者 中山 淳  
 長野県松本市旭3-1-1 国立大学法人  
 信州大学医学部内  
 (72) 発明者 白井 孝  
 東京都板橋区加賀1-8-1 公益財団法人  
 野口研究所内

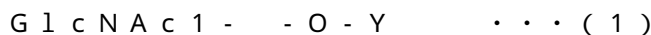
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ピロリ菌増殖抑制剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記化学式(1)



(式(1)中、Yは、アルキル基、アルコキシル基、アルケニル基、アルキニル基、アラ  
 ルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基を  
 示す)で表されるN-アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体含有していることを特  
 徴とするピロリ菌増殖抑制剤。

【請求項2】

飲食品添加物であることを特徴とする請求項1に記載のピロリ菌増殖抑制剤。

10

【請求項3】

請求項1に記載のピロリ菌増殖抑制剤を含んでいることを特徴とする医薬製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、消化性潰瘍や胃癌等の原因となるピロリ菌の増殖を抑制するN-アセチルグ  
 ルコサミン 結合糖誘導体含有するピロリ菌増殖抑制剤に関するものである。

【背景技術】

【0002】

ヘリコバクターピロリ菌(Helicobacter pylori)は、消化性潰瘍や慢性胃炎を発症さ

20

せる原因菌であり（非特許文献1、非特許文献2）、世界人口の半数に感染しているものと推察されている。

【0003】

ピロリ菌は、胃粘膜の表層から分泌される表層粘液内に棲息しているが、粘膜中ないし粘膜深層から分泌される腺粘液中に棲息していない。この腺粘液は、N-アセチルグルコサミン 残基（GlcNAc 残基）とガラクトース残基（Gal 残基）とを有するGlcNAc 1 4 Gal 残基含有O-グリカンの糖鎖を特徴的に含んでいる。そのため、この糖鎖は、胃粘膜をピロリ菌感染から防御しているという可能性が、示唆されていた。

【0004】

本発明者らは、GlcNAc 残基を非還元末端に有するコア2分岐型O-グリカンが結合した糖蛋白質糖鎖がピロリ菌の増殖を抑制することを見出し、さらに、この増殖抑制が、ヘリコバクター類（ピロリ菌を含む）のみが有するグルコシルコレステロール合成酵素（CHL GcT）（非特許文献3）の酵素活性阻害であることを明らかにしている（非特許文献4）。ピロリ菌は、その増殖のためにグリコシルコレステロール成分（CGL）を必須とするが、自らCGLを合成できないため、外界からコレステロールを摂取し、菌の細胞膜付近でグルコースを付加して細胞壁を構築していると、考えられている。従ってこのようなGlcNAc 残基を有するO-グリカンの糖蛋白質糖鎖は、この細胞壁の構築を阻害する性質があると推察されるから、ピロリ菌特異的な増殖抑制剤としての応用が期待できるが、複雑で高分子量の糖蛋白質糖鎖であり、制御し難い反応条件で煩雑な多工程を経て調製しなければならないうえ、莫大なコストと大掛かりな製造設備を必要とし、実用的ではない。

【0005】

また、特許文献1にGal 3 GlcNAc 構造を有するオリゴ糖であるヘリコバクターピロリ結合性物質が開示されている。しかしこの物質は、多糖であって構造が複雑なため、多工程を経て調製しなければならないうえ、大量かつ簡便に調製できない。

【0006】

一方、現在のピロリ菌感染の治療法は、これらの糖鎖を用いたものではなく、1種類のプロトンポンプ阻害薬と2種類の抗生物質との3剤併用による除菌が中心である。3剤併用療法では、耐性菌が出現して再発したり、副作用が発現したりするという問題を有する。

【0007】

昨今の飲食品や医薬製剤に対して、特に健康保全性・安全性に関心が高まる中、安心して継続して飲食したり服用したりできる簡易な構造のピロリ菌増殖抑制剤の開発が、望まれていた。

【0008】

本発明者らは、N-アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体がピロリ菌に対して優れた増殖抑制効果を有していることを見出して、既に特許文献2の出願をしている。

【0009】

さらに優れたピロリ菌増殖抑制剤の開発が望まれる。

【0010】

【非特許文献1】マーシャル ビージェー（Marshall BJ）ら、ランセット（Lancet）、1984年、第I巻、p.1311-1315

【非特許文献2】ピーク アールエム ジュニア（Peek RM Jr）ら、ネイチャー レビューズ キャンサー（Nature Reviews Cancer）、2002年、第2巻、p.28-37.

【非特許文献3】ヒライ ワイ（Hirai Y）ら、ジャーナル オヴ バクテリオロジー（Journal of Bacteriology）、1995年、第177巻、p.5327-5333.

【非特許文献4】カワクボ エム（Kawakubo M）ら、サイエンス（Science）、2004年、第305巻、p.1003-1006.

【特許文献1】特表2003-517015号公報

10

20

30

40

50

【特許文献2】国際公開第2008/084561号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は前記の課題を解決するためになされたもので、特異的にピロリ菌増殖を抑制する化合物を含有し、耐性菌を生じさせず、長期間飲食又は服用しても安全であって、大量かつ簡便に製造でき、飲食品や医薬製剤に用いることができるピロリ菌増殖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】

【0012】

本発明者らは、N-アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体が、N-アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体よりもさらに優れたピロリ菌増殖抑制効果を有していることを見出して、本発明を完成した。

【0013】

前記の目的を達成するためになされたもので特許請求の範囲の請求項1に記載されたピロリ菌増殖抑制剤は、下記化学式(1)



(式(1)中、Yは、アルキル基、アルコキシル基、アルケニル基、アルキニル基、アラールキル基、アリール基、ヘテロアリール基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基を示す)で表されるN-アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体を含有していることを特徴とする。

【0014】

なお、化学式(1)中、GlcNAcはN-アセチルグルコサミニル基を示す。

【0015】

請求項2に記載のピロリ菌増殖抑制剤は、請求項1に記載されたもので、飲食品添加物であることを特徴とする。

【0016】

請求項3に記載の医薬製剤は、請求項1に記載のピロリ菌増殖抑制剤を含んでいることを特徴とする。

【発明の効果】

【0017】

本発明のN-アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体を含有するピロリ菌増殖抑制剤は、その単糖誘導体がグルコシルコレステロール合成酵素(CHL GcT)を阻害しピロリ菌の増殖を抑制するので、ピロリ菌に対して抗菌的に作用するというものである。この単糖誘導体をヒトに投与しても、抗生物質投与時のような耐性菌出現の恐れがない。この単糖誘導体は、低分子量のグルコース誘導体であって複雑な化学構造でないから、簡便に製造でき、大量の工業的生産に適している。

【0018】

N-アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体を含有するピロリ菌増殖抑制剤は、この単糖誘導体がピロリ菌の細胞壁構築を阻害してピロリ菌の増殖を抑制するので、優れた抗ピロリ菌活性の薬効を示す。

【0019】

このN-アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体を単独で使用し、または抗生物質等と併用したピロリ菌増殖抑制剤は、ピロリ菌を胃内から完全に除去したり、慢性胃炎・消化性潰瘍・胃癌・胃悪性リンパ腫等の胃疾患の再発を防止したりすることができる。

【0020】

また、このN-アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体が、生体に存在するものであり、特異的にピロリ菌の増殖を抑制するものであるから、この増殖抑制剤は人体に対する安全性が高いものである。さらに、N-アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体、中でもエチル - N-アセチルグルコサミニド(GlcNAc1 - - O - Et)は、食品添加

10

20

30

40

50

物として広範に利用されている酵母エキス中に含有されていることが確かめられており、食経験上、安全な食材であることが明らかなことから、安心して、長期間、繰返し飲食や服用をする製品に用いることができる。

【0021】

本発明のピロリ菌増殖抑制剤を含有する飲食品は、胃疾患を軽減したり治癒したり予防したりするのに有用である。そのN - アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体が強いピロリ菌増殖抑制作用を発現するから、飲食品にピロリ菌増殖抑制剤を少量添加するだけで優れた抗ピロリ菌作用を奏する。

【0022】

本発明のピロリ菌増殖抑制剤を含有する医薬製剤は、ピロリ菌に由来する慢性胃炎や胃潰瘍等の胃疾患の治療・症状緩和・予防に用いられる。また、このN - アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体が強いピロリ菌増殖抑制作用を発現するので、この医薬製剤を少量服用するだけで優れた抗ピロリ菌作用を奏し、副作用が発現せず、内科的治療で胃疾患を治癒するのに、有用である。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】本発明を適用するN - アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体(GlcNAc 1 - - O - Et)を含有するピロリ菌増殖抑制剤による抗ピロリ菌作用を示すグラフである。

【図2】本発明の適用外のN - アセチルグルコサミン(GlcNAc)による抗ピロリ菌作用を示すグラフである。

【図3】本発明の適用外のエタノールによる抗ピロリ菌作用を示すグラフである。

【図4】本発明を適用するN - アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体(GlcNAc 1 - - O - Et)を含有するピロリ菌増殖抑制剤の投与の有無の場合のスナネズミの体重変化を示すグラフである。

【図5】本発明を適用するN - アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体(GlcNAc 1 - - O - Et)を含有するピロリ菌増殖抑制剤の投与の有無によるスナネズミの摘出胃に起因するピロリ菌コロニー数を示すグラフである。

【図6】本発明の適用外のN - アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体(GlcNAc 1 - - O - Et)による抗ピロリ菌作用を示すグラフである。

【図7】本発明の適用外のN - アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体(GlcNAc 1 - - O - Et)の投与の有無の場合のスナネズミの体重変化を示すグラフである。

【図8】本発明の適用外のN - アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体(GlcNAc 1 - - O - Et)の投与の有無によるスナネズミの摘出胃に起因するピロリ菌コロニー数を示すグラフである。

【発明を実施するための好ましい形態】

【0024】

以下、本発明の実施例を詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0025】

本発明のピロリ菌増殖抑制剤は、N - アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体を含有するもので、食品添加物や医薬製剤の有効成分となるものである。このN - アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体は、前記式(1)のとおりGlcNAc 1 - - O - Yで示され、Yが、炭素数1 ~ 27のアルキル基やアルコキシル基やアルケニル基やアルキニル基、ベンジルのようなアラルキル基、フェニルのようなアリアル基、ヘテロアリアル基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、コレステロール基等であるというもので、N - アセチルグルコサミニル(GlcNAc)基が Yで結合した構造を持っている。

【0026】

また、ピロリ菌増殖抑制剤は、食品添加物として酵母エキス中に存在する報告がなされているエチル基を有する化合物(GlcNAc 1 - - O - Et)(イワハラ(Iwahara S

10

20

30

40

50

)他、バイオサイエンス、バイオテクノロジー、アンド バイオケミストリー (Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry)、1993年、第57巻、第10号、p.1779-1780)が好ましい。

【0027】

N - アセチルグルコサミン 結合単糖誘導体、例えば  $GlcNAc1 - - O - Et$  は、単独でもピロリ菌に対して優れた増殖抑制効果を有している。この単糖誘導体の5 mM以上の濃度の培養液がピロリ菌と共存している場合、ピロリ菌の増殖を50%以下に抑える。特に20 mM以上の濃度の培養液では、増殖を5%以下に抑える。この単糖誘導体は、培養液中で安定であり、また胃内でも、数時間は分解しないものである。

【0028】

このN - アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体、特に  $GlcNAc1 - - O - Et$  は、単糖であることに加えて、1段階の合成方法で簡便に得ることができるので、大規模な製造を可能とする。さらにこの単糖誘導体は、N - アセチルグルコサミニルの脂肪族炭化水素基置換体であって、その置換部位がエーテル結合であるので、とりわけ安定である。また、アルキル基のようなこの脂肪族炭化水素基は極めて安全な残基である。この単糖誘導体は、人体に有害な残基がないために、その安全性がとりわけ高く飲食品や医薬製剤に含ませることが可能なものである。

【0029】

これらのN - アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体は、ピロリ菌増殖抑制剤として用いられる。これらの糖誘導体は、単独で用いられてもよく、複数を混合して用いてもよく、またランソプラゾールやオメプラゾールのようなプロトンポンプ阻害薬の1種とアモキシシリンおよびクラリスロマイシンのような抗生物質の2種とを併用してもよい。

【0030】

これらのN - アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体を含有するピロリ菌増殖抑制剤は、飲食品に添加する飲食品添加剤として用いられる。飲食品として、ヨーグルト等の乳製品のような食品、水やココアやジュースのような飲料品が挙げられる。飲食品には、N - アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体をピロリ菌増殖抑制有効成分として0.02~1%好ましくは0.1~1%含有していることが好ましい。これら飲食品は、継続して摂取するものであると、ピロリ菌増殖抑制効果が高まり、慢性胃炎のような胃疾患等の消化性疾患の予防をすることができるので、一層好ましい。

【0031】

このピロリ菌増殖抑制剤は、医薬製剤に含有させる薬効成分としても用いられる。医薬製剤は、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、丸剤、乳剤、散剤、シロップ剤、液剤、又は注射剤であってもよい。このような医薬製剤は、賦形剤、蒸留水、生理食塩水等の製剤成分や、別な医薬成分を含んでいてもよい。これら医薬製剤を単回服用、又は継続服用すると、ピロリ菌増殖抑制効果が高まり、慢性胃炎のような胃疾患等の消化性疾患を治癒又は症状軽減をすることができるので、一層好ましい。

【実施例】

【0032】

以下に、本発明のN - アセチルグルコサミニル 結合糖誘導体を合成し、ピロリ菌増殖抑制剤等を調製した例を示す。

【0033】

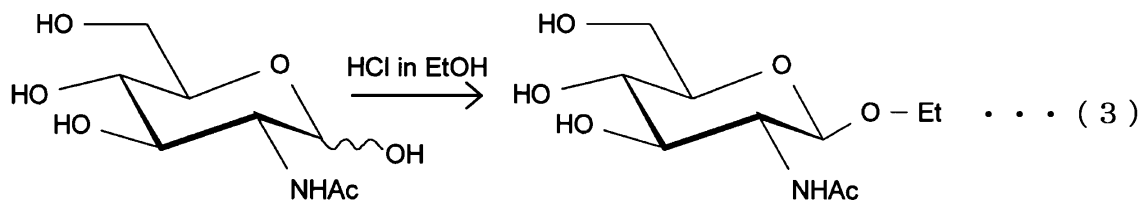
(実施例1)

(1.1  $GlcNAc1 - - O - Et$  (2)の化学合成)

本発明を適用する前記化学式(1)のN - アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体の一例であるエトキシ2 - アセトアミド 2 - デオキシ - N - アセチル - - D - グルコサミニド ( $GlcNAc1 - - O - Et$  (2))について詳細に説明する。この誘導体は、下記化学反応式(3)のようにして合成される。

【0034】

## 【化1】



## 【0035】

N-アセチル-D-グルコサミン 3.0131 g (13.62 mmol) を 200 ml ナス型フラスコに入れ、HCl ガスを吹き込んだ EtOH (50.0 ml) に溶解させ、塩化カルシウム管を取り付け室温で攪拌させた。反応の確認は、薄層クロマトグラフ(TLC)(展開溶媒 クロロホルム/メタノール(3:1))で行った。17時間後、NaHCO<sub>3</sub> を加え中和した後、無機物をセライト濾過し、濃縮後ピンク色の結晶が析出した。これをフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離することで、体 2.4 g、体 0.6 g をそれぞれ白色結晶として(収率: 体 75%、体 19%)得た。

10

## 【0036】

(1.2 GlcNAc 1-O-Et (2) の同定)

GlcNAc 1-O-Et (2) である 体生成物の確認は、600 MHz - 核磁気共鳴スペクトル法(NMR)にて行った。

20

## 【0037】

<sup>1</sup>H-NMR (600MHz, D<sub>2</sub>O); 1.03(1H, dd, J=6.9, 7.6Hz -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.91(1H, s, COCH<sub>3</sub>), 3.30(1H, dd, J=6.9, 9.6Hz, H-4), 3.31-3.34(1H, m, H-5), 3.40(1H, dd, J=8.2, 10.3Hz, H-3), 3.52-3.56(2H, m, H-2 and H-6a), 3.62(1H, dd, J=5.5, 12.4Hz, CH<sub>2a</sub>CH<sub>3</sub>), 3.74-3.80(2H, m, H-6b and CH<sub>2b</sub>CH<sub>3</sub>), 4.41(1H, d, J=8.9Hz, H-1)

<sup>13</sup>C-NMR (150MHz, D<sub>2</sub>O); 15.3(-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 23.2(CH<sub>3</sub>CO), 56.7(C-2), 61.9(-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 67.3(C-6), 71.0(C-5), 75.1(C-3), 77.0(C-4), 101.8(C-1), 175.7(CH<sub>3</sub>CO)

## 【0038】

この分光学的データは、この 体生成物が GlcNAc 1-O-Et (2) であることを支持する。

30

## 【0039】

この GlcNAc 1-O-Et (2) を含有するピロリ菌抑制剤を調製し、その生物学的有効性評価について、以下のようにして検討した。

## 【0040】

(実施例 2)

(2.1 GlcNAc 1-O-Et (2) を含有するピロリ菌増殖抑制剤の調製、及びその抗ピロリ菌作用の確認: in vitro)

GlcNAc 1-O-Et のピロリ菌への効果を以下の手順で確認した。-80 でブルセラブロス培養液中に凍結保存されているピロリ菌(ATCC 43504)を、ウマ血清 10% 入り同培養液中(3 mL)で 35、CO<sub>2</sub> 15% で 40 時間震盪培養し、顕微鏡下で菌の動きを観察した後、非コッコイド型であるピロリ菌を得た。OD (吸光度) 600 nm を測定し、ウマ血清 5.5% 入りミュラーヒントン培養液に菌数 4 × 10<sup>7</sup> になるように希釈し、計 3 mL を 35、CO<sub>2</sub> 15% で 24 時間震盪培養した後顕微鏡で確認し、上記化合物の効果を確認するための試験に用いるピロリ菌含有培養液(菌濃度; 2 × 10<sup>7</sup> / mL)とした。一方、上記の GlcNAc 1-O-Et の 6.25 mM, 12.5 mM, 25 mM, 50 mM 及び 100 mM のウマ血清 5% 入りであってピロリ菌を含有しないミュラーヒントン培養液をそれぞれ作製し、これらをそれぞれのピロリ菌含有培養液に体積比 1:1 (全容積 100 μL、96 well プレート上)で添加

40

50

、混和した後、35℃、CO<sub>2</sub> 15%で、96時間培養した。一定時間培養後、増殖した菌の濃度をOD 600 nmで測定し、化合物を添加したものと、添加していないネガティブコントロール(図1中のコントロール: cont)とを比較し、増殖抑制効果を見積もった。

#### 【0041】

(2.2 in vitroでのピロリ菌の増殖抑制の結果)

GlcNAc 1 - - O - Etを用いた結果を図1に示す。図1から明らかな通り、GlcNAc 1 - - O - Etを25~50 mM以上添加した場合、ピロリ菌の増殖が50%以上阻害されることが示された。

#### 【0042】

(2.3 in vitroでのGlcNAc 1 - - O - Etの分解の結果)

培養開始から3日後のピロリ菌含有培養液に含まれているGlcNAc 1 - - O - Etについて所定量を高速液体クロマトグラフィーで測定し、予め作成した所定量の各種濃度とそれの高速液体クロマトグラムの面積とによる検量線から、GlcNAc 1 - - O - Etの濃度を換算した結果、GlcNAc 1 - - O - Etの初期濃度の6%が消失していた。このことから、GlcNAc 1 - - O - Etのうちの6%が、GlcNAcとエタノール(EtOH)とに分解したことが分かった。

#### 【0043】

(比較例1)

GlcNAc 1 - - O - Etの分解産物であるGlcNAcが、ピロリ菌の増殖抑制効果を有しないことを確認するため、実施例2のGlcNAc 1 - - O - EtをGlcNAcに変更した以外は、実施例2と同様の手順でピロリ菌を培養した。一定時間培養後、増殖した菌の濃度をOD 600 nmで測定し、GlcNAcを添加したものと、添加していないネガティブコントロール(図2中のコントロール: cont)とを比較し、増殖抑制効果を見積もった。

#### 【0044】

GlcNAcを用いた結果を図2に示す。図2から明らかな通り、GlcNAc 1 - - O - Etが分解して生じたGlcNAcは、50 mMもの極高濃度にしても、ピロリ菌の増殖抑制効果がないことが示された。

#### 【0045】

(比較例2)

GlcNAc 1 - - O - Etの分解産物であるエタノールが、ピロリ菌の増殖抑制効果を有しないことを確認するため、実施例2のGlcNAc 1 - - O - Etをエタノールの1.25容量%(214 mM)、2.5容量%(428 mM)、5容量%(856 mM)に変更した以外は実施例2と同様の手順でピロリ菌を培養した。一定時間培養後、増殖した菌の濃度をOD 600 nmで測定し、エタノールを添加したものと、添加していないネガティブコントロール(図3中のコントロール: cont)とを比較し、増殖抑制効果を見積もった。

#### 【0046】

エタノールを用いた結果を図3に示す。図3から明らかな通り、GlcNAc 1 - - O - Etが分解して生じたエタノールは、5容量%もの極高濃度にしなれば、ピロリ菌の増殖抑制効果がないことが示された。

#### 【0047】

したがって、GlcNAc 1 - - O - Etがピロリ菌増殖抑制の活性発現本体であり、その分解産物はピロリ菌増殖抑制の活性を発現しないことが示された。

#### 【0048】

(実施例3)

(3.1 GlcNAc 1 - - O - Et(2)を含有するピロリ菌増殖抑制剤の調製、及びその抗ピロリ菌作用の確認: in vivo)

スナネズミのヘリコバクターピロリ菌経口感染の試験系を用い、GlcNAc誘導体の

10

20

30

40

50

ヘリコバクターピロリ菌に対する抗菌作用を *in vivo* で検討した。

【0049】

(3.2(1) 実験動物)

九動吉富(株)より4週齢で購入した雄性スナネズミ(SPF)を23日間予備飼育して実験に供した。スナネズミは予備飼育期間および実験期間を通して室温 $24 \pm 3$ 、相対湿度 $55 \pm 15\%$ の感染動物飼育室(照明時間7時~19時、換気回数18回/時)で飼育した。スナネズミは2~3匹/ケージとし、飲水は精製水を、飼料は粉末飼料(MF、オリエンタル酵母工業(株)製)を、それぞれ自由に与えた。また、スナネズミは色素(ピクリン酸溶液)塗布法で個体識別した。

【0050】

(3.2(2) 感染菌株および菌液の調製)

感染菌株としてヘリコバクターピロリの標準菌株(ATCC 43504株)を使用した。保存菌株に10%ウマ血清(大日本住友製薬(株)製)を含むブレイン-ハートインフュージョン(BHI)培地(日水製薬(株)製)を加えて復元し、同培地中で37の微好気条件下(微好気培養装置使用)で3日間培養し、約 $5 \times 10^6$  CFU/mlの濃度とした。

【0051】

(3.2(3) ヘリコバクターピロリの感染方法)

ヘリコバクターピロリ感染の24時間前より感染4時間後まで絶食した。この絶食したスナネズミにヘリコバクターピロリ培養液の1.0ml(目標)を経口投与した( $5 \times 10^6$  CFU/animal目標)。なお、感染日を第0日とする。

【0052】

(3.2(4) 被験物質の調製および投与)

被験物質としてN-アセチルグルコサミン誘導體(GlcNAc1-β-O-Et)を下記群構成に示した濃度で用いた。

【0053】

(3.2(5) 群構成)

動物数: 10匹/群

投与方法: 混餌

投与量: 粉末飼料へ0.3%混合

【0054】

【表1】

表 1

群 No.	群 名 (化合物名)	匹数	推定投与量 (mg/kg/day)
1	対 照	10	0
2	GlcNAc1-β-O-Et	10	300

【0055】

(3.3 検査項目)

(3.3(1) 体重)

感染日を第0日とし、第1, 3, 6, 10, 13, 17, 20, 24および26日に、



体重計で測定した。その結果を図4に示す。

【0056】

(3.3(2) 一般症状)

一般症状の変化を毎日観察した。

【0057】

(3.3(3) 菌数測定(コロニー数))

各群10匹から胃を摘出しリン酸緩衝液(PBS-)5mlを含む遠心管に入れ、ポリトロンホモジナイザーで均質化した。そのホモジネート0.1mlをポアViヘリコ-S寒天培地(栄研化学(株)製)に塗抹し前培養と同様な37の好気条件下で7日間以上培養後、形成された紫色のコロニーを計数した。

10

【0058】

(3.4 統計処理)

体重およびコロニー数は群毎の平均値±標準誤差を算出した。対照群に対する各群の統計的有意差を検定するため、解析ソフト(エクセル統計2006, 社会情報サービス)を用いBartlett検定で等分散性を確認した後、Dunnett法で各群を比較した。等分散性が確認できなかった場合は、値を対数変換して同様にDunnett法で各群を比較した。いずれの場合も $p < 0.05$ の場合を統計学的に有意であるとする。その結果を図5に示す。

【0059】

(3.5 in vivoでの結果)

20

ピロリ菌生育が環境に相当左右されることから、ピロリ菌増殖抑制剤投与群と、非投与である対照群との相対比較を行う必要がある。図4から明らかな通り、GlcNAc1-O-Et(2)を含有するピロリ菌増殖抑制剤投与群と、非投与である対照群とで、体重の増加に有意差は認められず、外見上の一般症状の異常も認められなかった。図5(a)から明らかな通り、図4の体重変化と表1の推定投与量から算出したGlcNAc1-O-Etの300mg/kg/dayに相当する一日当りの投与量20mg/dayが、対照群に比べ、ピロリ菌数を1/2~1/3に低減させていることを見出した。一方、同図(a)に示すように、各群で数匹の異常に高いピロリ残存菌数を持つ個体があったため、危険度は高いがこれらの値をはずれ値として考え、スミルノフ・グラブス検定によって、はずれ値を除外すると、図5(b)のようにGlcNAc1-O-Et(2)を含有するピロリ菌増殖抑制剤投与群が、対照群に比べて1/6に抑えていることがわかった。

30

【0060】

(比較例3)

実施例1のGlcNAc1-O-Etの投与量300mg/kg/day(表1参照)に代えて、GlcNAc1-O-Etを300、又は1000mg/kg/day用いたこと以外は、実施例2と同様にして、増殖抑制効果、体重変化、一般症状観察、菌数測定(コロニー数)を行い、同様に統計処理した。増殖抑制効果の結果を図6に示し、体重変化の結果を図7に示し、菌数測定の結果を図8に示す。

【0061】

図6から明らかな通り、GlcNAc1-O-Etには、GlcNAc1-O-Etに比べ、in vitroで、殆どピロリ菌増殖抑制効果は認められなかった。また、図7から明らかな通り、GlcNAc1-O-Etを含有するピロリ菌増殖抑制剤投与群と、非投与である対照群とで、体重の増加に有意差は認められず、外見上の一般症状の異常も認められなかった。図8から明らかな通り、in vivoで、GlcNAc1-O-Etの低投与量の300mg/kg/dayが、対照群と有意差が無かったが、それより遥かに高投与量のGlcNAc1-O-Etの1000mg/kg/dayでようやく、対照群と有意差が認められ、対照群に比べ、ピロリ菌数を1/3に抑えていた。

40

【0062】

従って、ピロリ菌増殖抑制剤は、ピロリ菌増殖抑制飲食品や医薬製剤としても、用いられることが示された。

50

【産業上の利用可能性】

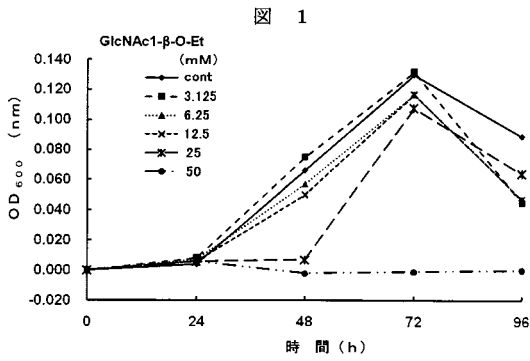
【0063】

N - アセチルグルコサミニル 結合単糖誘導体は、従来の抗生物質とは全く異なり、あらゆるピロリ菌の生育に必須の増殖活動を抑制するという機序でピロリ菌に対する抗菌作用を示すから、抗ピロリ菌剤として有用である。

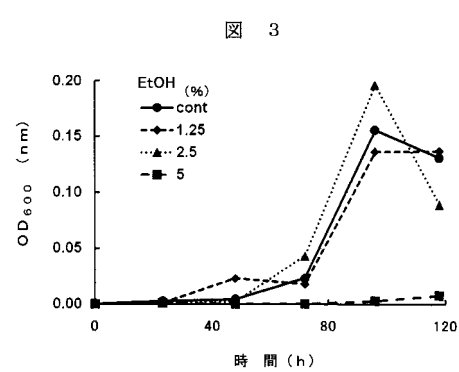
【0064】

これらの糖誘導体を含有するピロリ菌増殖抑制剤は、サプリメントや飲食品添加物として有用である。またそのピロリ菌増殖抑制剤を含有する飲食品は、機能性飲食品や健康飲食品として有用である。そのピロリ菌増殖抑制剤を含有する医薬製剤は、ピロリ菌に起因する消化器系疾患、特に胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍のような胃疾患を軽減したり治癒したり予防したりする医薬品として、有用である。

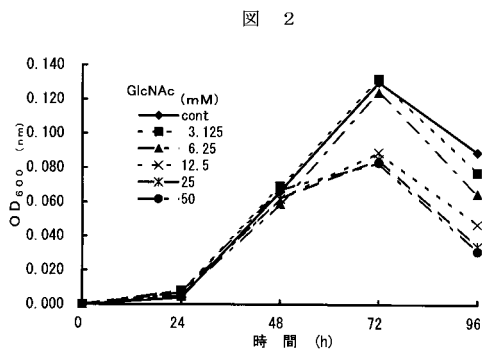
【図1】



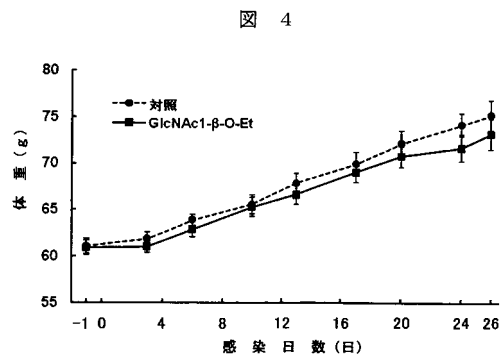
【図3】



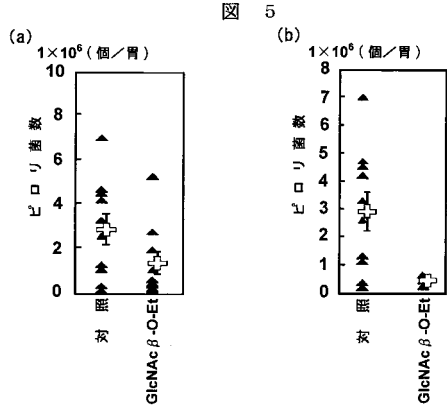
【図2】



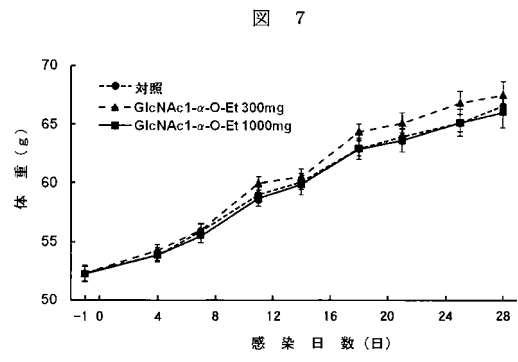
【図4】



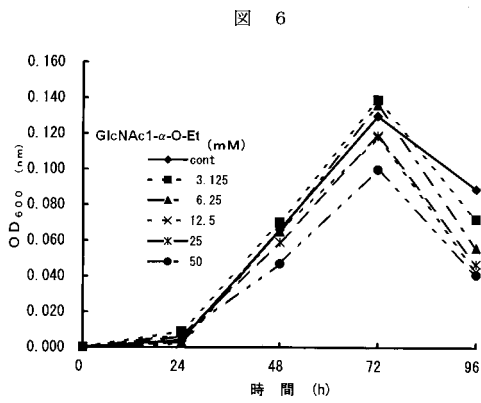
【 図 5 】



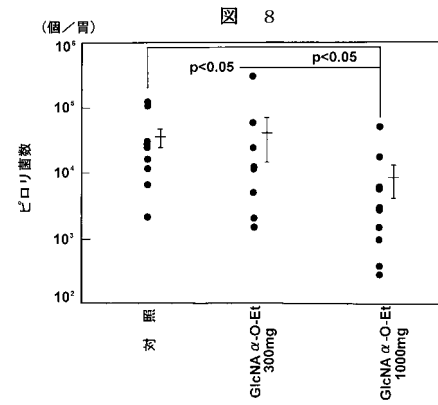
【 図 7 】



【 図 6 】



【 図 8 】



## フロントページの続き

- (72)発明者 山ノ井 孝  
東京都板橋区加賀 1 - 8 - 1 公益財団法人野口研究所内
- (72)発明者 藤田 雅也  
東京都板橋区加賀 1 - 8 - 1 公益財団法人野口研究所内
- (72)発明者 森 昌子  
東京都板橋区加賀 1 - 8 - 1 公益財団法人野口研究所内

審査官 水島 英一郎

- (56)参考文献 米国特許第02710807 (US, A)  
国際公開第2008/084561 (WO, A1)  
特開2007-246426 (JP, A)  
国際公開第2008/032817 (WO, A1)  
KAWAGISHI, H., et al., A lectin from an edible mushroom *Pleurotus ostreatus* as a food intake-suppressing substance, *Biochim. Biophys. Acta*, 1474, pp.299-308 (2000)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07H 15/04  
A23L 1/30  
A23L 2/52  
A61K 31/7028  
A61P 1/04  
A61P 31/04  
BIOSIS (STN)  
CAplus (STN)  
EMBASE (STN)  
MEDLINE (STN)  
REGISTRY (STN)  
JSTPlus (JDreamII)  
JMEDPlus (JDreamII)  
JST7580 (JDreamII)