

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年5月6日(06.05.2010)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 2010/050369 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 38/00 (2006.01) A61P 1/02 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01) A61Q 11/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/067903
- (22) 国際出願日: 2009年10月16日(16.10.2009)
- (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 2008-280806 2008年10月31日(31.10.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人岡山大学(National University Corporation Okayama University) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 Okayama (JP). 株式会社グライエンス (GLYENCE Co.,Ltd) [JP/JP]; 〒4640858 愛知県名古屋市千種区千種2-2-8 Aichi (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高柴 正悟 (TAKASHIBA, Shogo) [JP/JP]; 〒7008558 岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 吉田 靖弘 (YOSHIDA, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒7008558 岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 伊東 孝 (ITO, Takashi) [JP/JP]; 〒7008558 岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 今村 幸治 (IMAMURA, Koji) [JP/JP]; 〒4640858 愛知県名古屋市千種区千種2-2-8 株式会社グライエンス内 Aichi (JP). 竹内 英明 (TAKEUCHI, Hideaki) [JP/JP]; 〒4640858 愛知県名古屋市千種区千種2-2-8 株式会社グ
- ライエンス内 Aichi (JP). 岡本 英治 (OKAMOTO, Eiji) [JP/JP]; 〒4640858 愛知県名古屋市千種区千種2-2-8 株式会社グライエンス内 Aichi (JP).
- (74) 代理人: 牛木 護 (USHIKI, Mamoru); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目14番1号 郵政福祉琴平ビル3階 Tokyo (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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, 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 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: PROPHYLACTIC AGENT FOR DENTAL CARIES

(54) 発明の名称: 虫歯予防剤

(57) Abstract: Disclosed is a prophylactic agent for dental caries, which comprises a lectin which has an activity to prevent or inhibit the binding between a biopolymer derived from saliva from Japanese persons who live on Japanese foods and an oral bacterium, particularly *Streptococcus mutans* that a bacterium believed to cause dental caries. Specifically disclosed is a prophylactic agent for dental caries, which is characterized by comprising a lectin selected from the group consisting of AAL, ABA, ACA, ACG, BPL, GRFT, Jacalin, MAH, RCA-I and the like. Also disclosed are a pharmaceutical composition, a food composition, a dentifrice and an oral washer, each of which comprises the prophylactic agent for dental caries.

(57) 要約: 日本食をとって生活する日本人の唾液由来の生体高分子と口腔細菌、特に、虫歯の原因とされるストレプトコッカス・ミュータンスとの結合を抑制又は阻害する活性のあるレクチンを含む虫歯予防剤を開発すること。本発明は、AAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-I等からなるグループから選択されるレクチンを含むことを特徴とする虫歯予防剤を提供する。本発明は、本発明の虫歯予防剤を含む医薬品組成物、食品組成物、歯磨き剤及び口内洗浄剤を提供する。



WO 2010/050369 A1

明 細 書

発明の名称：虫歯予防剤

技術分野

[0001] 本発明は、レクチンを含む虫歯予防剤、特に、口腔内のプラーク又はバイオフィームへの付着及び増殖を抑制する効果を有するレクチンを含む虫歯予防剤と、該虫歯予防剤を含む、医薬品組成物、食品組成物、歯磨き剤及び口内洗浄剤とに関する。

背景技術

[0002] 口腔細菌は、口腔内のプラーク又はバイオフィームに付着して増殖し、齲蝕すなわち虫歯や歯槽膿漏その他の歯周病を引き起こす。前記プラーク又はバイオフィームは、唾液由来の生体高分子が歯の表面に付着してペリクルという皮膜を形成し、該ペリクルに口腔細菌が付着することにより成長する。したがって虫歯や歯周病の予防のためにはペリクルへの口腔細菌の付着を抑制又は阻止する必要がある。エリスリトール、キシリトール等の糖アルコール類には虫歯抑制効果があることが知られているが、糖アルコールは口腔細菌の代謝によりう蝕の原因となる乳酸を産生しないために虫歯が出来にくくなるものであり、口腔細菌の付着の抑制や阻止には関与しない。

[0003] 口腔細菌がペリクルや他の口腔細菌の菌体が付着する際には、口腔細菌の産生する糖鎖結合タンパク質レクチンが関与していると考えられる。つまり、ペリクルに滞積した唾液由来の生体高分子、すなわち、多糖類又は糖タンパク質と口腔細菌レクチンとが糖鎖特異的な結合を行うことにより、ペリクルに口腔細菌が付着すると考えられる。すると、外部から口腔細菌のレクチンと競合するレクチンを口腔内に投与することによって、ペリクルの糖鎖への口腔細菌のレクチンの結合を阻害すれば、口腔細菌のバイオフィームへの付着及び増殖を抑制又は阻害して、虫歯や歯周病のような口腔細菌による感染症を予防することができる。

[0004] 実際にこのような発想に基づいて、口腔細菌とペリクルとの結合を阻害す

るレクチンが非特許文献1ないし3に報告されている。これらの文献で報告されたレクチンには、植物由来のグルコース・マンノース認識レクチンや、藻類由来のムチン認識レクチンがある。

先行技術文献

非特許文献

- [0005] 非特許文献1: Teixeira, E. H. ら、J Appl. Microbiol.、101: 111-6 (2006)。
非特許文献2: Teixeira, E. H. ら、J Appl. Microbiol.、103: 1001-6 (2007)。
非特許文献3: Islam, B. ら、J Appl. Microbiol.、106: 1682-9 (2009)。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0006] しかし、Con A (コンカナバリンA) のようなグルコース・マンノース認識レクチンは、ほ乳類のリンパ球の幼若化反応を誘発することが知られており、免疫系に影響を与えるおそれがある。また、ヒトの唾液成分は人種、食物等によって変化することが知られている。そこで、日本食をとって生活する日本人の唾液由来の生体高分子と口腔細菌、特に、虫歯の原因とされるストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*、以下、「ミュータンス菌」という。) との結合を抑制又は阻害する活性のあるレクチンを含む虫歯予防剤を開発する必要がある。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明は、レクチンを含むことを特徴とする虫歯予防剤を提供する。
- [0008] 本発明の虫歯予防剤において、前記レクチンは $Fuc\alpha 1-6GlcNAc$ 、 $Fuc\alpha 1-3GalNAc$ 、 $Gal\beta 1-3GalNAc$ 、 $GlcNAc$ 、 $Gal\beta 1-3GalNAc$ 、 $Sialyl\alpha 2-3lactose$ 、 $Gal\beta 1-3GalNAc$ 、 $Sialyl-Gal\beta 1-3GalNAc$

c、Sialyl α 2-3Gal β 1-3GalNAc、Gal及びGalNAcからなるグループから選択される少なくとも1種類の糖鎖を認識する場合がある。

[0009] 本発明の虫歯予防剤において、前記レクチンは、(1) AAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと、(2) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と、(3) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列に記載のアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、それぞれAAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと同じ糖鎖認識特異性を有するタンパク質と、(4) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列と80%以上の相同性を示すアミノ酸配列からなり、かつ、それぞれAAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと同じ糖鎖認識特異性を有するタンパク質と、(5) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってエンコードされるアミノ酸配列からなり、かつ、それぞれAAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと同じ糖鎖認識特異性を有するタンパク質と、からなるグループから選択される1種類又は2種類以上のタンパク質の場合がある。

[0010] 本発明の虫歯予防剤において、前記レクチンは、シアル酸を認識する場合がある。

[0011] 本発明の虫歯予防剤において、前記レクチンは、ACG、MAH及びJacalinからなるグループから選択される場合がある。

[0012] 本発明の虫歯予防剤において、前記レクチンは、ABA、ACA、ACG、BPL及びRCA-Iからなるグループから選択される場合がある。

[0013] 本発明の虫歯予防剤において、前記レクチンは、マンノース又はNアセチルグルコサミンを認識する場合がある。

- [0014] 本発明の虫歯予防剤において、前記レクチンは、GRFTの場合がある。
- [0015] 本発明は、本発明の虫歯予防剤を含む医薬品組成物を提供する。
- [0016] 本発明は、本発明の虫歯予防剤を含む食品組成物を提供する。
- [0017] 本発明は、本発明の虫歯予防剤を含む歯磨き剤を提供する。
- [0018] 本発明は、本発明の虫歯予防剤を含む口内洗浄剤を提供する。
- [0019] 本発明は、レクチンを含む虫歯予防剤を口腔内に投与するステップを含む、虫歯の予防方法を提供する。
- [0020] 本発明の虫歯の予防方法において、前記レクチンは、 $Fuc\alpha 1-6GlcNAc$ 、 $Fuc\alpha 1-3GalNAc$ 、 $Gal\beta 1-3GalNAc$ 、 $GlcNAc$ 、 $Gal\beta 1-3GalNAc$ 、 $Sialyl\alpha 2-3lactose$ 、 $Gal\beta 1-3GalNAc$ 、 $Sialyl-Gal\beta 1-3GalNAc$ 、 $Sialyl\alpha 2-3Gal\beta 1-3GalNAc$ 、 Gal 及び $GalNAc$ からなるグループから選択される少なくとも1種類の糖鎖を認識する場合がある。
- [0021] 本発明の虫歯の予防方法において、前記レクチンは、(1) AAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと、(2) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と、(3) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列に記載のアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、それぞれAAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと同じ糖鎖認識特異性を有するタンパク質と、(4) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列と80%以上の相同性を示すアミノ酸配列からなり、かつ、それぞれAAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと同じ糖鎖認識特異性を有するタンパク質と、(5) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってエンコードされるアミノ酸配列からなり、かつ、それぞれA

AL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと同じ糖鎖認識特異性を有するタンパク質と、からなるグループから選択される1種類又は2種類以上のタンパク質の場合がある。

[0022] 本発明の虫歯の予防方法において、前記レクチンはシアル酸を認識する場合がある。

[0023] 本発明の虫歯の予防方法において、前記レクチンは、ACG、MAH及びJacalinからなるグループから選択される場合がある。

[0024] 本発明の虫歯の予防方法において、前記レクチンは、ABA、ACA、ACG、BPL及びRCA-Iからなるグループから選択される場合がある。

[0025] 本発明の虫歯の予防方法において、前記レクチンは、マンノース又はNアセチルグルコサミンを認識する場合がある。

[0026] 本発明の虫歯の予防方法において、前記レクチンは、GRFTの場合がある。

[0027] 本発明は、レクチンの虫歯予防用医薬品組成物の製造のための使用を提供する。

[0028] 本発明の虫歯予防用医薬品組成物の製造のための使用において、前記レクチンは、 $Fuc\alpha 1-6GlcNAc$ 、 $Fuc\alpha 1-3GalNAc$ 、 $Gal\beta 1-3GalNAc$ 、 $GlcNAc$ 、 $Gal\beta 1-3GalNAc$ 、 $Sialyl\alpha 2-3lactose$ 、 $Gal\beta 1-3GalNAc$ 、 $Sialyl-1-Gal\beta 1-3GalNAc$ 、 $Sialyl\alpha 2-3Gal\beta 1-3GalNAc$ 、Gal及びGalNAcからなるグループから選択される少なくとも1種類の糖鎖を認識する場合がある。

[0029] 本発明の虫歯予防用医薬品組成物の製造のための使用において、(1) AAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと、(2) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と、(3) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列に記載のアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、それぞれAAL、ABA、ACA、ACG、

BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと同じ糖鎖認識特異性を有するタンパク質と、(4) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列と80%以上の相同性を示すアミノ酸配列からなり、かつ、それぞれAAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと同じ糖鎖認識特異性を有するタンパク質と、(5) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってエンコードされるアミノ酸配列からなり、かつ、それぞれAAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと同じ糖鎖認識特異性を有するタンパク質と、からなるグループから選択される1種類又は2種類以上のタンパク質の場合がある。

- [0030] 本発明の虫歯予防用医薬品組成物の製造のための使用において、前記レクチンはシアル酸を認識する場合がある。
- [0031] 本発明の虫歯予防用医薬品組成物の製造のための使用において、前記レクチンは、ACG、MAH及びJacalinからなるグループから選択される場合がある。
- [0032] 本発明の虫歯予防用医薬品組成物の製造のための使用において、前記レクチンは、ABA、ACA、ACG、BPL及びRCA-Iからなるグループから選択される場合がある。
- [0033] 本発明の虫歯予防用医薬品組成物の製造のための使用において、前記レクチンは、マンノース又はNアセチルグルコサミンを認識する場合がある。
- [0034] 本発明の虫歯予防用医薬品組成物の製造のための使用において、前記レクチンはGRFTの場合がある。
- [0035] 本発明のレクチンは、ヤナギマツタケ由来のACG (Agrocyclindracea galectin) と、アミヒラタケ由来のPSL1 α (Polyporus squamosus lectin 1 alpha) と、ムジナタケ由来のPVL (Psathyrella vel

utina lectin) と、ラッパズイセン由来のNPL (Narcissus pseudonarcissus lectin) と、ヒイロチャワンタケ由来のAAL (Aleuria aurantia lectin) と、マッシュルーム由来のABA (Agaricus bisporus agglutinin) と、ヒモゲイトウ由来のACA (Amaranthus caudatus agglutinin) と、ムラサキソシンカ由来のBPL (Bauhinia purpurea lectin) と、ジャックフルーツ (Artocarpus integrifolia) 由来のJacalinと、ヒマ由来のRCA-I (Ricinus communis agglutinin-I) と、イヌエンジュ由来のMAH (Maackia amurensis hemagglutinin) と、紅藻 (Griffithsia sp.) 由来のGRFTとを含むが、これらに限定されない。

[0036] 本発明のレクチンが認識する糖鎖は、Sialyl α 2-6Gal、Gal β 1-4GlcNAc、GlcNAc β 1-2Man、Neu5Ac2-3Gal1-4GlcNAc1-2Man1-6 (Neu5Ac2-3/6 (Neu5Ac-2-3Gal1-4) GlcNAc1-4 (Neu5Ac2-3/6Gal1-4GlcNAc1-2) Man1-3) Man、Man α 1-6Man、Gal β 1-3GalNAc、Sialyl-Gal β 1-3GalNAc、Fuc α 1-6GlcNAc、Fuc α 1-3GalNAc、Gal β 1-3GalNAc、GlcNAc、Gal β 1-3GalNAc、Sialyl α 2-3lactose、Gal β 1-3GalNAc、Mannose、GlcNAc、Sialyl-Gal β 1-3GalNAc、Sialyl α 2-3Gal β 1-3GalNAc、Gal、GalNAcを含むが、これらに限定されない。

[0037] 本発明のレクチンのうち、AAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iのアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号1ないし9に記載される。

- [0038] 本発明のタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列からなるレクチンと同じ糖鎖認識特異性を有することを条件として、配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたものであってもよい。ここで、前記欠失、置換又は付加されるアミノ酸の数は、糖鎖の特異性認識に関与するドメイン以外の部位であれば10個又は11個以上であってもかまわない。前記欠失、置換又は付加されるアミノ酸の数は、1、2、3、4、5、6、7、8又は9の場合がある。
- [0039] 本明細書においてアミノ酸配列の相同性は、本発明のアミノ酸配列と、比較対象のアミノ酸配列との間で配列が一致するアミノ酸残基の数が最も多くなるように整列させて、配列が一致するアミノ酸残基の数の合計を本発明のアミノ酸配列のアミノ酸残基の総数で割った商の百分率で表される。本発明のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の相同性は、当業者に周知の配列整列プログラムCLUSTALWを使用することにより算出することができる。
- [0040] 本発明のタンパク質のアミノ酸配列の相同性は、それぞれ相同性が100%のアミノ酸配列からなるレクチンと同じ糖鎖認識特異性を有することを条件として、80%以上の場合があり、85%以上が好ましく、90%以上がより好ましく、95%以上がさらに好ましい。
- [0041] 本明細書において「ストリンジентな条件」とは、Sambrook、J. 及びRussell、D. W.、Molecular Cloning A Laboratory Manual 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)に説明されるサザンブロット法で以下の実験条件で行うことを指す。比較対象のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドをアガロース電気泳動によりバンドを形成させた上で毛管現象又は電気泳動によりニトロセルロースフィルターその他の固相に不動化する。6× SSC及び0.2% SDSからなる溶液で前洗浄する。本発明のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを放射性同位元素その他の標識物質で標識したプローブと

前記固相に不動化された比較対象のポリヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーション反応を $6 \times \text{SSC}$ 及び $0.2\% \text{ SDS}$ からなる溶液中で 65°C 、終夜行う。その後前記固相を $1 \times \text{SSC}$ 及び $0.1\% \text{ SDS}$ からなる溶液中で 65°C 、各30分ずつ2回洗浄し、 $0.2 \times \text{SSC}$ 及び $0.1\% \text{ SDS}$ からなる溶液中で 65°C 、各30分ずつ2回洗浄する。最後に前記固相に残存するプローブの量を前記標識物質の定量により決定する。本明細書において「ストリンジেন্টな条件」でハイブリダイゼーションをすることは、比較対象のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを不動化した固相に残存するプローブの量が、本発明のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを不動化した陽性対照実験の固相に残存するプローブの量の少なくとも 25% 、好ましくは少なくとも 50% 、より好ましくは少なくとも 75% 以上であることを指す。

[0042] 以下の実施例で説明するとおり、本発明のレクチンが共通して認識する糖鎖は、 GalNAc 又は $\text{Gal} \beta 1-3 \text{GalNAc}$ である。唾液中に含まれる糖蛋白質のムチンはセリン/スレオニンに GalNAc が結合した糖鎖 (Tn 抗原) か、 $\text{Gal} \beta 1-3 \text{GalNAc}$ が結合した糖鎖 (T 抗原) かが糖鎖の基本骨格となっている。本明細書の実施例の結果から、ミュータンス菌はムチンの Tn 抗原又は T 抗原を認識して唾液中に結合していることが示唆された。Tn 抗原又は T 抗原を認識するレクチンには本発明の実施例で用いた他に以下のものが知られている。

HSL (Holothuria scabra lectin) 由来生物種：ハネジナマコ

AVL (Amaranthus viridis lectin) 由来生物種：ホナガイヌビ

AAItL (Artocarpus altilis lectin) 由来生物種：パンノキ

AHA (Artocarpus hirsuta agglutinin) 由来生物種：インド産パンノキ属樹木

ALA (Artocarpus lakoocha agglutinin)
由来生物種：ラクチパンノキ

APA (Abrus precatorius agglutinin) 由来生物種：トウアズキ

ALL (Amaranthus leucocarpus lectin)
由来生物種：ヒユ属植物

CBL (Clarias batrachus lectin) 由来生物種：インド産ナマズ

SSL (Salvia sclarea lectin) 由来植物：クラリセージ

ARA (Agropyrum repens agglutinin) 由来生物種：シバムギ

LDeIL (Lactarius deliciosus lectin)
由来生物種：チチタケ属食用キノコ

LDetL (Lactarius deterrimus lectin)
由来生物種：アカハツモドキ

VGA (Vicia graminea agglutinin) 由来生物種：ソラマメ属植物

MLL (Moluccella laevis lectin) 由来生物種：カイガラサルビア

[0043] 本発明の虫歯予防剤に含まれるレクチンは、以上に説明された由来生物種の個体、組織、細胞又はその一部から精製されたタンパク質か、組換えDNA技術によってさまざまな宿主で発現され精製されたタンパク質か、あるいは、前記由来生物種の個体、組織、細胞又はその一部か、その部分精製標品かであって、口腔内に投与されると腔内硬組織への口腔細菌、特に、ミュータンス菌の付着及び増殖を抑制又は阻害する作用を発揮するのに十分な活性を有するものかの場合がある。すなわち、前記レクチンは由来生物種の個体、組織、細胞又はその一部そのもの、あるいは、その加工物として利用され

る場合がある。

[0044] 本発明の医薬品組成物は、口腔内硬組織への口腔細菌、特に、ミュータンス菌の付着及び増殖を抑制又は阻害するための全ての医薬品を含み、本発明のレクチンが口腔細菌と唾液由来の生体高分子との結合を抑制又は阻害する活性を実質的に損なわないことを条件として、他のいかなる成分を含むものであってもかまわない。

[0045] 本発明の食品組成物は、本発明のレクチンが口腔細菌と唾液由来の生体高分子との結合を抑制又は阻害する活性を実質的に損なわないことを条件として、他のいかなる成分を含むものであってもかまわない。本発明の食品組成物は、エリスリトール、キシリトール等の糖アルコール類を含む場合がある。

[0046] 本発明の歯磨き剤又は口内洗浄剤は、本発明のレクチンが口腔細菌と唾液由来の生体高分子との結合を抑制又は阻害する活性を実質的に損なわないことを条件として、他のいかなる成分を含むものであってもかまわない。

図面の簡単な説明

[0047] [図1] ミュータンス菌の付着及び増殖に対するレクチンによる抑制効果を示す棒グラフ。

[図2] レクチンによるミュータンス菌の増殖抑制効果を示す顕微鏡写真。

[図3] ミュータンス菌の付着及び増殖に対するシアル酸認識レクチンによる抑制効果を示す棒グラフ。

[図4] 異なる被験者由来の唾液でコーティングされた基質上でのミュータンス菌の増殖に対するレクチンによる抑制効果を示す棒グラフ。

[図5] 異なる被験者由来の唾液でコーティングされた基質上でのミュータンス菌の増殖に対するレクチンによる抑制効果を示す棒グラフ。

[図6] 異なる被験者由来の唾液でコーティングされた基質上でのミュータンス菌の増殖に対するレクチンによる抑制効果を示す棒グラフ。

[図7] 異なる被験者由来の唾液でコーティングされた基質上でのミュータンス菌の増殖に対するレクチンによる抑制効果を示す棒グラフ。

[図8] 図4-7の同一条件ごとの吸光度の測定値の平均から算出された同一条件ごとの抑制指数をプロットした棒グラフ。

[図9] 3種類のマルチバレントビオチン化糖ポリマーとミュータンス菌との相互作用を示す棒グラフ。

発明を実施するための形態

[0048] 以下に説明する本発明の実施例は例示のみを目的とし、本発明の技術的範囲を限定するものではない。本発明の技術的範囲は特許請求の範囲の記載によつてのみ限定される。

実施例 1

[0049] ミュータンス菌の付着及び増殖に対するレクチンによる抑制効果の検討
マルチプレート（平底、96穴、ポリスチレン製、Nunc社 マルチソープ467140）に歯磨き後2時間のヒト唾液又はBSA（ウシ血清アルブミン、100 μ g/mLをPBSに溶解）を100 μ L添加して、37 $^{\circ}$ Cで2時間コーティングを行った。その後前記マルチプレートをPBSで洗浄し、100 μ g/mLのレクチンを100 μ L添加して37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベーションした。用いたレクチンは、ACG（*Agroclybe cylindracea* galectin）、OAA（*Oscillatoria agardhii* agglutinin）、MVL（*Microcystis viridis* lectin）、GRFT（*Griffithsia*）、EPL（*Enteromorpha prolifera* lectin）、Con A（*Concanavalin A*）、GNA（*Galanthus nivalis* agglutinin）、NPL（*Narcissus pseudonarcissus* lectin）、PNA（*Peanut agglutinin*）、AAL（*Aleuria aurantia* Lectin）、PHA-L（*Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin）及びRCA（*Ricinus communis* agglutinin）であった。その後前記マルチプレートをPBSで洗浄し、100 μ LのPBS中の 5×10^7 個のミ

ユータンス菌を各ウェルに添加して37°Cで終夜培養した。前記プレートにPBSで洗浄し、0.25%のグルタルアルデヒド/PBSを100 μ L添加して室温で30分固定した。その後PBSで洗浄し、2.3%のクリスタルバイオレット（グラム染色用）を100 μ L添加して室温で1時間染色した。その後流水で洗浄し、エタノールを100 μ L添加して室温で1時間色素を溶出した。菌体数の定量は、プレートリーダーを用いて各ウェルのエタノール液中の色素濃度を吸光波長570nmで測定することによって実施された。

[0050] 結果

図1は、ユータンス菌の付着及び増殖に対するレクチンによる抑制効果を示す棒グラフである。図1では同一条件ごとに2回重複して実験を行った。唾液によるコーティングを行わなかったウェル（saliva⁻）と、ユータンス菌を添加しなかったウェル（St. mutans⁻）とは有意な吸光度を示さなかった。唾液によるコーティングを行ったが、レクチンによるインキュベーションを行わなかったウェル（lectin⁻）の吸光度は0.10であった。唾液のかわりにBSAによるインキュベーションを行ったウェル（BSA）の吸光度は、lectin⁻の半分の0.05であった。レクチンのうち、MVL及びEPLによるインキュベーションを行ったウェルの吸光度は0.15を超えており、OAA、Con A、PNA、PHA-L及びRCAによるインキュベーションを行ったウェルの吸光度はほぼ0.10であり、GRFT、GNA及びAALによるインキュベーションを行ったウェルの吸光度は0.05と0.10の間であったが、ACG及びNPLによるインキュベーションを行ったウェルの吸光度は0.05未満であった。これらの結果から、唾液によるコーティングによるユータンス菌のウェル基質への付着及び増殖の促進はBSAによって部分的に阻害された。そこで、ユータンス菌のウェル基質への付着には非特異的な吸着の寄与が無視できないことが明らかになった。しかし、ACG及びNPLはユータンス菌の付着及び増殖をBSAより強力に抑制した。そこで、ACG及びNPLはミ

ュータンス菌の付着及び増殖を特異的に阻害する可能性が高いと考えられた。

[0051] 図2は、本実施例のそれぞれの条件を示す表と、各条件でのミュータンス菌の増殖を顕微鏡で観察した結果を示す顕微鏡写真とである。陽性対照条件 (lectin⁻) のウェルでは、ミュータンス菌が基質表面に拡がってコロニーを形成した。しかし、唾液によるコーティングを行わなかった条件 (saliva⁻) と、ACGによるインキュベーションを行った条件 (ACG) と、NPLによるインキュベーションを行った条件 (NPL) とでは、ミュータンス菌はほとんど基質上にみられなかった。以上の形態学的な観察結果は吸光度による定量的な測定結果 (図1) に対応していた。

実施例 2

[0052] ミュータンス菌の付着及び増殖に対する他のシアル酸認識レクチンによる抑制効果の検討

実施例1の結果から、レクチンACG及びNPLは虫歯菌のプラーク・バイオフィルム形成を抑制する効果が期待できる。これらのうちACGはシアル酸認識レクチンに属する。そこで、ACGの他、PSL1 α (Polyporus squamosus lectin 1 alpha)、PVL (Psathyrella velutina lectin)、MAL (Maackia amurensis leucoagglutinin)、MAH (Maackia amurensis hemagglutinin) とSSA (Sambucus sieboldiana agglutinin)、SNA (Sambucus nigra agglutinin)、LFA (Limax flavus agglutinin) 及びWGA (Wheat germ agglutinin) というシアル酸認識レクチンについて、実施例1と同じ手順でミュータンス菌の付着及び増殖に対する抑制効果を検討した。

[0053] 結果

図3は、ミュータンス菌の付着及び増殖に対するシアル酸認識レクチンに

よる抑制効果を示す棒グラフである。図3では同一条件ごとに2回重複して実験を行った。ミュータンス菌を添加しなかったウェル (St. mutans-) は有意な吸光度を示さなかった。唾液によるコーティングを行ったが、レクチンによるインキュベーションを行わなかったウェル (lectin-) の吸光度は0.45であった。今回検討されたシアル酸認識レクチンのうち、MAH、SSA、SNA、LFA及びWGAはほぼ唾液によるコーティングを行ったが、レクチンによるインキュベーションを行わなかったウェル (lectin-) に近い吸光度であり、ミュータンス菌の付着及び増殖を抑制する効果がほとんど認められなかった。しかし、PSL1 α 及びPVLについてはACGに近い吸光度であり、ミュータンス菌の付着及び増殖を抑制する効果が認められた。

[0054] 今回ミュータンス菌の付着及び増殖を抑制する効果が認められたレクチンが認識する糖鎖を表1に示す。

[0055] [表1]

レクチン	生物種 (学名)	生物種 (和名)	認識糖鎖
ACG	<i>Agrocybe cylindracea</i>	ヤナギマツタケ	Sialyl α 2-3lactose Gal β 1-3 GalNAc
PSL1	<i>Polyporus squamosus</i>	アミヒラタケ	Sial α 2-6Gal, Gal β 1-4GlcNAc
PVL	<i>Psathyrella velutina</i>	ムジナタケ	GlcNAc β 1-2Man シアル酸等酸性糖鎖 Neu5Ac2-3Gal1-4GlcNAc1-2Man1-6(Neu5Ac2-3/6 (Neu5Ac-2-3Gal1-4)GlcNAc1-4 (Neu5Ac2-3/6Gal1-4GlcNAc1-2) Man1-3)Man
NPL	<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	ラッパスイセン	Man α 1-6Man

実施例 3

[0056] 拡大スクリーニング

本実施例では、実施例1又は2とは異なる4名の被験者由来のヒト唾液でコーティングされた基質へのミュータンス菌の増殖に対する70種類のレク

チンの効果を調べた。

[0057] マイクロプレート（Nunc社、マルチソープ467140）の各ウェルに歯磨き後3時間の唾液100 μ Lを添加し、37 $^{\circ}$ C、2時間コーティングを行った。その後、前記マイクロプレートをPBSで洗浄し、TBS（50mM Tris-HCl、150mM NaCl、1mM CaCl₂、1mM MnCl₂）で100 μ g/mLに希釈されたレクチン又はBSA100 μ Lを各ウェルに添加して、37 $^{\circ}$ C、1時間反応させた。その後、PBSで洗浄し、100 μ LのPBS中の5 \times 10⁷個のミュータンス菌（ATCC25175）を37 $^{\circ}$ C、終夜培養した。菌をPBSで洗浄し、0.25% グルタルアルデヒド/PBSを100 μ L添加して室温で30分固定した。その後PBSで洗浄し、2.3% クリスタルバイオレットを100 μ L添加して、室温で1時間染色した。その後流水で洗浄し、エタノールを100 μ L添加して室温で1時間色素を溶出した。菌体数の定量は、プレートリーダーを用いて各ウェルのエタノール液中の色素濃度を吸光波長570nmで測定することによって実施された。

[0058] 用いたレクチンは以下のとおりであった。天然レクチンは、EY Laboratories社製のAAA、APP、BDA、CA、CAA、CSA、DBA、DSA、ECA、GNA、GS-I I、HPA、Jacalin、LAA、LBA、LFA、Lotus、NPA、PNA、PSA、PTA-Gal、PTA-GalNAc、PWM、SHA、SJA、SNA、STA、TKA、TL、UDA、UEA-I、UEA-I I、VFA、WGA及びRCA-Iと、Vector Laboratories社製のACA、BPL、EEL、GNL、DSL-I I、HHL、MAL、NPL、PHA-E4、PTL-I、PTL-I I、ScWGA、WFL及びMAHと、生化学工業株式会社製のAAL、ABA、Con A、SBA、SSA、TJA-I、TJA-I Iとであった。組換えレクチンは、rACG及びrGRFTで、これらはグライエンス社内で調製された。

[0059] 結果

図4-7はそれぞれ異なる被験者由来の唾液でコーティングされた基質上でのミュータンス菌の増殖に対するレクチンによる抑制効果を示す棒グラフである。いずれも同一条件ごとに2回重複して実験を行った。各図の左端から4本の棒グラフは対照実験の結果で、左端から順にレクチン-、ミュータンス菌-及び唾液-（ウェルのみ）と、レクチン-、ミュータンス菌+及び唾液-（ミュータンス菌のみ）と、レクチン-、ミュータンス菌-及び唾液+（唾液のみ）と、レクチン-、ミュータンス菌+及び唾液+（唾液+ミュータンス菌（レクチン無しの陽性対照））という4種類の条件であった。唾液によるコーティングを行わなかったウェルと、ミュータンス菌を添加しなかったウェルとは、有意なミュータンス菌の増殖を示さなかった。唾液によるコーティングを行ったが、レクチンによるインキュベーションを行わなかったウェルと、唾液のかわりにBSAによるインキュベーションを行ったウェル（BSA）とでは、ミュータンス菌の増殖が認められた。図4-7に示すとおり、唾液を適用した被験者ごとにミュータンス菌の増殖を抑制するレクチンの種類及び抑制効果の程度に差が見られた。また、BSAによるミュータンス菌の増殖抑制効果の程度も、被検者ごとに異なっていた。

[0060] 図8は、図4-7の同一条件ごとの吸光度の測定値の平均 A_x と、同一被験者ごとの唾液によるコーティングを行わなかったウェルの吸光度の測定値の平均 A_n と、同一被験者ごとの唾液によるコーティングを行ったが、レクチンによるインキュベーションを行わなかったウェルの吸光度の測定値の平均 A_p とから、同一条件ごとの抑制指数 I_x を以下の式を用いて算出してプロットした棒グラフである。

$$I_x = 100 \times (A_x - A_n) / (A_p - A_n)$$

[0061] 図8に示すとおり、調べたレクチンのうちAAL、ABA、ACA、BPL、Jacalin、RCA-I、MAH、ACG及びGRFTについては、ミュータンス菌の増殖を抑制する効果が認められた。

[0062] 本実施例に用いたレクチンが認識する糖鎖を表2に示す。

[0063]

[表2]

レクチン	生物種 (学名)	生物種 (和名)	認識糖鎖
AAL	<i>Aleuria aurantia</i>	ヒイロチャワンタケ	Fuc α 1-6 GlcNAc, Fuc α 1-3 GalNAc
ABA	<i>Agaricus bisporus</i>	マッシュルーム	Gal β 1-3 GalNAc GlcNAc
ACA	<i>Amaranthus caudatus</i>	ヒモゲイトウ	Gal β 1-3 GalNAc
ACG	<i>Agrocybe cylindracea</i>	ヤナギマツタケ	Sialyl α 2-3lactose Gal β 1-3 GalNAc
BPL	<i>Bauhinia purpurea</i>	ムラサキソシンカ	Gal β 1-3 GalNAc
GRFT	<i>Griffithsia sp.</i>	不明 (紅藻)	Mannose GlcNAc
Jacalin	<i>Artocarpus integrifolia</i>	ジャックフルーツ	Sialyl-Gal β 1-3 GalNAc
MAH	<i>Maackia amurensis</i>	イヌエンジュ	Sialyl α 2-3 Gal β 1-3 GalNAc
RCA-I	<i>Ricinus communis</i>	ヒマ	Gal, GalNAc

実施例 4

[0064] 合成糖鎖とミュータンス菌との相互作用

本実施例では、固相に吸着された合成糖鎖とミュータンス菌との結合を表面プラズモン効果によって測定して、ミュータンス菌と糖鎖との特異的な相互作用を定量的に解析した。

[0065] 以下の4種類のマルチバレントビオチン化糖ポリマー (GlycoTech社) を用いた。

$\text{HOCH}_2 (\text{HOCH})_4 \text{CH}_2 \text{NH-PAA-biotin}$ (対照)

$\text{Gal } \beta 1-3 \text{GalNAc } \alpha \text{-PAA-biotin}$ (Core1)

$\text{GlcNAc } \beta 1-3 \text{GalNAc } \alpha \text{-PAA-biotin}$ (Core3)

$\text{Neu5Ac } \alpha 2-3 \text{Gal } \beta 1-3 \text{GalNAc } \alpha \text{-PAA-biotin}$ (Sialyl T)

[0066] 前記マルチバレントビオチン化糖ポリマーはそれぞれPBSで50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈され、10°Cのピアコア社製センサーチップ (BR-1000

−32) に10 μ L/分の流速でローディングされ、Biacore 2000で約1000RUの測定値に達するまでセンサー基板表面に固相化された。

[0067] ミュータンス菌は、Todd-Hewitt Brothで37°C、終夜培養され、1,000 \times g、10分間の遠心により上清除去後、等量のPBSに懸濁された。同様の操作を2度繰り返して洗浄した後、660nmでの吸光度を測定した。測定した吸光度を基に、ミュータンス菌はPBSでOD660=0.05又は0.1に希釈され、ミュータンス菌サンプル液が調製された。前記サンプル液は、密封され、25°Cで5時間保温された後測定に供された。前記マルチバレントビオチン化糖ポリマーが固相化されたセンサーチップに10 μ L/分の流速で40 μ Lの前記サンプル液が添加され、PBSを10 μ L/分の流速で1分間流してセンサー基板表面をリンスした後、Biacore 2000で測定した。図10は、Core1、Core3及びSialyl Tのポリマーにミュータンス菌サンプル液を添加してリンスした後の測定値から、対照ポリマーにミュータンス菌サンプル液を添加してリンスした後の測定値を差し引いた値を示す棒グラフである。

[0068] 結果

図9に示すとおり、Core1ポリマーは他のポリマーより格段に強くミュータンス菌と相互作用した。そこで、唾液由来の糖鎖のうちガラクトースを末端に含む糖鎖はミュータンス菌の基質への付着に関与することが実証された。したがって、本発明のレクチンを含む虫歯予防剤と、該虫歯予防剤を用いる虫歯予防方法とは、唾液由来の糖鎖、特に、ガラクトースを末端に含む糖鎖とミュータンス菌との相互作用を阻害すると考えられる。

請求の範囲

- [請求項1] レクチンを含むことを特徴とする虫歯予防剤。
- [請求項2] 前記レクチンは $\text{Fuc}\alpha 1-6\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Fuc}\alpha 1-3\text{GalNAc}$ 、 $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$ 、 GlcNAc 、 $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$ 、 $\text{Sialyl}\alpha 2-3\text{lactose}$ 、 $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$ 、 $\text{Sialyl-Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$ 、 $\text{Sialyl}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$ 、 Gal 及び GalNAc からなるグループから選択される少なくとも1種類の糖鎖を認識することを特徴とする、請求項1に記載の虫歯予防剤。
- [請求項3] 前記レクチンは、
- (1) AAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと、
 - (2) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と、
 - (3) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列に記載のアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、それぞれAAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと同じ糖鎖認識特異性を有するタンパク質と、
 - (4) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列と80%以上の相同性を示すアミノ酸配列からなり、かつ、それぞれAAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと同じ糖鎖認識特異性を有するタンパク質と、
 - (5) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってエンコードされるアミノ酸配列からなり、かつ、それぞれAAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと

同じ糖鎖認識特異性を有するタンパク質と、
からなるグループから選択される1種類又は2種類以上のタンパク質
であることを特徴とする、請求項1に記載の虫歯予防剤。

[請求項4] 前記レクチンはシアル酸を認識することを特徴とする、請求項1に
記載の虫歯予防剤。

[請求項5] 前記レクチンは、ACG、MAH及びJacalinからなるグル
ープから選択されることを特徴とする、請求項4に記載の虫歯予防剤
。

[請求項6] 前記レクチンは、ABA、ACA、ACG、BPL及びRCA-I
からなるグループから選択されることを特徴とする、請求項1に記載
の虫歯予防剤。

[請求項7] 前記レクチンは、マンノース又はNアセチルグルコサミンを認識す
ることを特徴とする、請求項1に記載の虫歯予防剤。

[請求項8] 前記レクチンはGRFTであることを特徴とする、請求項8に記載
の虫歯予防剤。

[請求項9] 請求項1ないし8のいずれか1つに記載の虫歯予防剤を含むことを
特徴とする、医薬品組成物。

[請求項10] 請求項1ないし8のいずれか1つに記載の虫歯予防剤を含むことを
特徴とする、食品組成物。

[請求項11] 請求項1ないし8のいずれか1つに記載の虫歯予防剤を含むことを
特徴とする、歯磨き剤。

[請求項12] 請求項1ないし8のいずれか1つに記載の虫歯予防剤を含むことを
特徴とする、口内洗浄剤。

[請求項13] レクチンを含む虫歯予防剤を口腔内に投与するステップを含むこと
を特徴とする、虫歯の予防方法。

[請求項14] 前記レクチンはFuc α 1-6GlcNAc、Fuc α 1-3Gal
INAc、Gal β 1-3GalINAc、GlcNAc、Gal β 1
-3GalINAc、Sialyl α 2-3lactose、Gal β

1-3GalNAc、Sialyl-Gal β 1-3GalNAc、Sialyl α 2-3Gal β 1-3GalNAc、Gal及びGalNAcからなるグループから選択される少なくとも1種類の糖鎖を認識することを特徴とする、請求項13に記載の虫歯の予防方法。

[請求項15]

前記レクチンは、

- (1) AAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと、
 - (2) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と、
 - (3) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列に記載のアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、それぞれAAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと同じ糖鎖認識特異性を有するタンパク質と、
 - (4) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列と80%以上の相同性を示すアミノ酸配列からなり、かつ、それぞれAAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと同じ糖鎖認識特異性を有するタンパク質と、
 - (5) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってエンコードされるアミノ酸配列からなり、かつ、それぞれAAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと同じ糖鎖認識特異性を有するタンパク質と、
- からなるグループから選択される1種類又は2種類以上のタンパク質であることを特徴とする、請求項13に記載の虫歯の予防方法。

[請求項16]

前記レクチンはシアル酸を認識することを特徴とする、請求項13に記載の虫歯の予防方法。

- [請求項17] 前記レクチンは、ACG、MAH及びJacalinからなるグループから選択されることを特徴とする、請求項16に記載の虫歯の予防方法。
- [請求項18] 前記レクチンは、ABA、ACA、ACG、BPL及びRCA-Iからなるグループから選択されることを特徴とする、請求項13に記載の虫歯の予防方法。
- [請求項19] 前記レクチンは、マンノース又はNアセチルグルコサミンを認識することを特徴とする、請求項13に記載の虫歯の予防方法。
- [請求項20] 前記レクチンは、GRFTであることを特徴とする、請求項19に記載の虫歯の予防方法。
- [請求項21] レクチンの虫歯予防用医薬品組成物の製造のための使用。
- [請求項22] 前記レクチンは、 $Fuc\alpha 1-6GlcNAc$ 、 $Fuc\alpha 1-3GalNAc$ 、 $Gal\beta 1-3GalNAc$ 、 $GlcNAc$ 、 $Gal\beta 1-3GalNAc$ 、 $Sialyl\alpha 2-3lactose$ 、 $Gal\beta 1-3GalNAc$ 、 $Sialyl-Gal\beta 1-3GalNAc$ 、 $Sialyl\alpha 2-3Gal\beta 1-3GalNAc$ 、Gal及びGalNAcからなるグループから選択される少なくとも1種類の糖鎖を認識することを特徴とする、請求項21に記載の使用。
- [請求項23] 前記レクチンは、
- (1) AAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと、
 - (2) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と、
 - (3) 配列番号1ないし9に記載のアミノ酸配列に記載のアミノ酸配列に1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、それぞれAAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH及びRCA-Iと同じ糖鎖認識特異性を有するタンパク質と、

(4) 配列番号 1 ないし 9 に記載のアミノ酸配列と 80%以上の同一性を示すアミノ酸配列からなり、かつ、それぞれ AAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH 及び RCA-I と同じ糖鎖認識特異性を有するタンパク質と、

(5) 配列番号 1 ないし 9 に記載のアミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってエンコードされるアミノ酸配列からなり、かつ、それぞれ AAL、ABA、ACA、ACG、BPL、GRFT、Jacalin、MAH 及び RCA-I と同じ糖鎖認識特異性を有するタンパク質と、

からなるグループから選択される 1 種類又は 2 種類以上のタンパク質であることを特徴とする、請求項 21 に記載の使用。

[請求項24] 前記レクチンはシアル酸を認識することを特徴とする、請求項 21 に記載の使用。

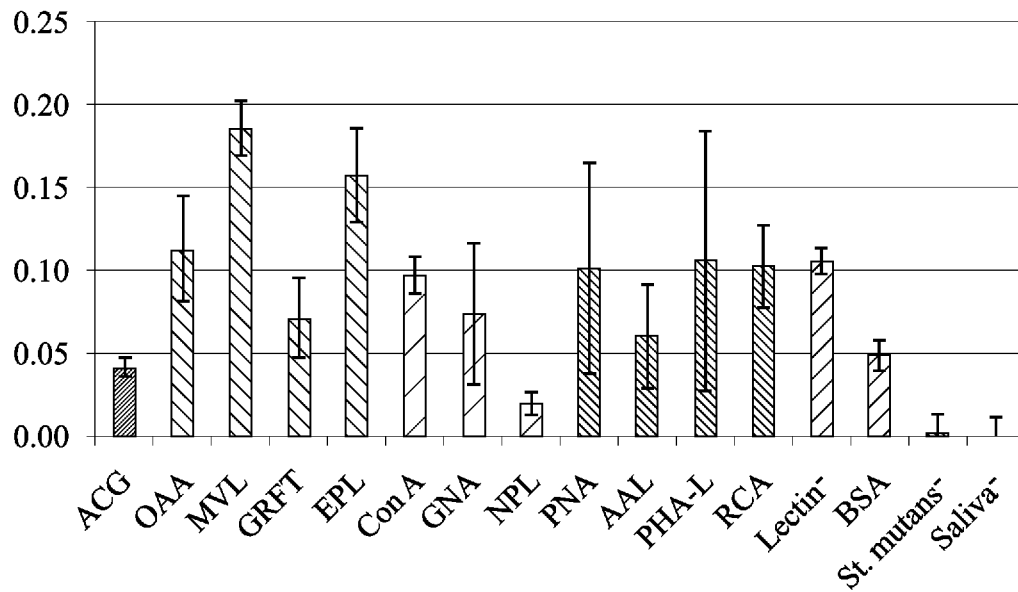
[請求項25] 前記レクチンは、ACG、MAH 及び Jacalin からなるグループから選択されることを特徴とする、請求項 24 に記載の使用。

[請求項26] 前記レクチンは、ABA、ACA、ACG、BPL 及び RCA-I からなるグループから選択されることを特徴とする、請求項 21 に記載の使用。

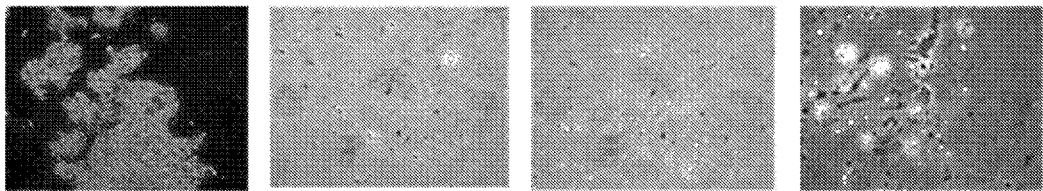
[請求項27] 前記レクチンは、マンノース又は N アセチルグルコサミンを認識することを特徴とする、請求項 21 に記載の使用。

[請求項28] 前記レクチンは GRFT であることを特徴とする、請求項 27 に記載の使用。

[図1]

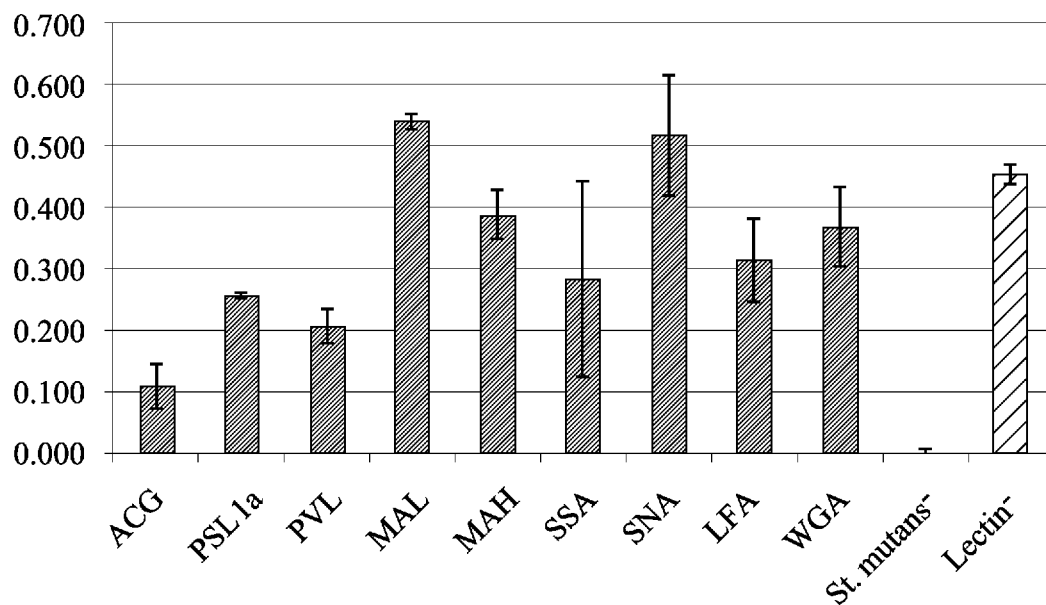


[図2]

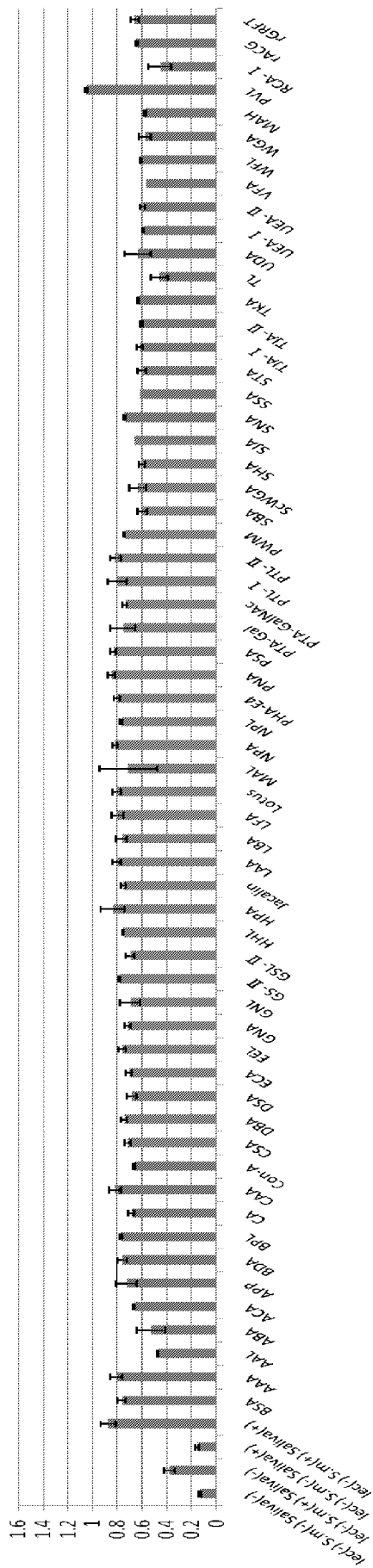


	Lectin ⁻	Saliva ⁻	ACG	NPL
唾液	+	-	+	+
菌	+	+	+	+
レクチン	-	-	+	+

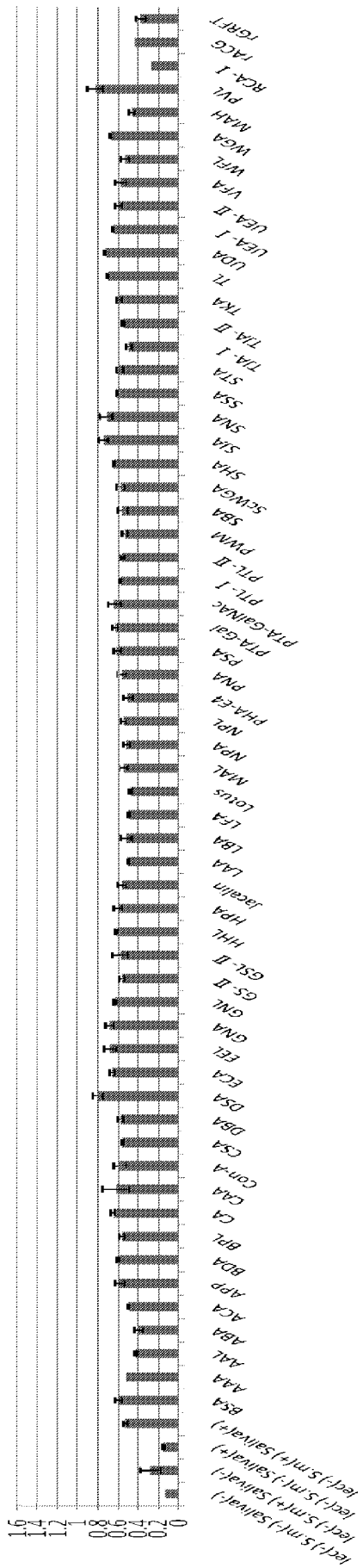
[図3]



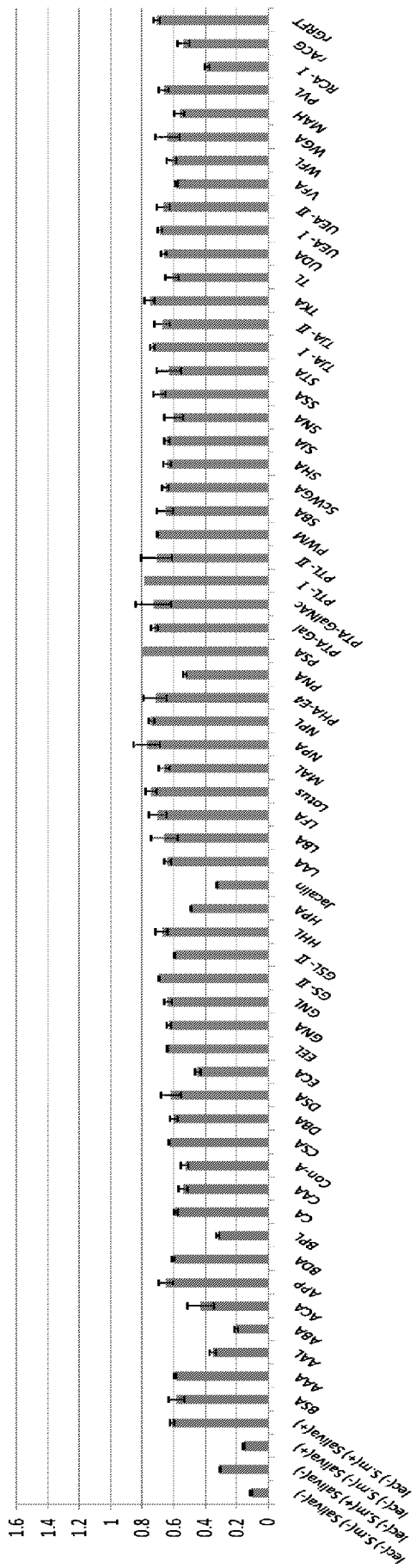
[図4]



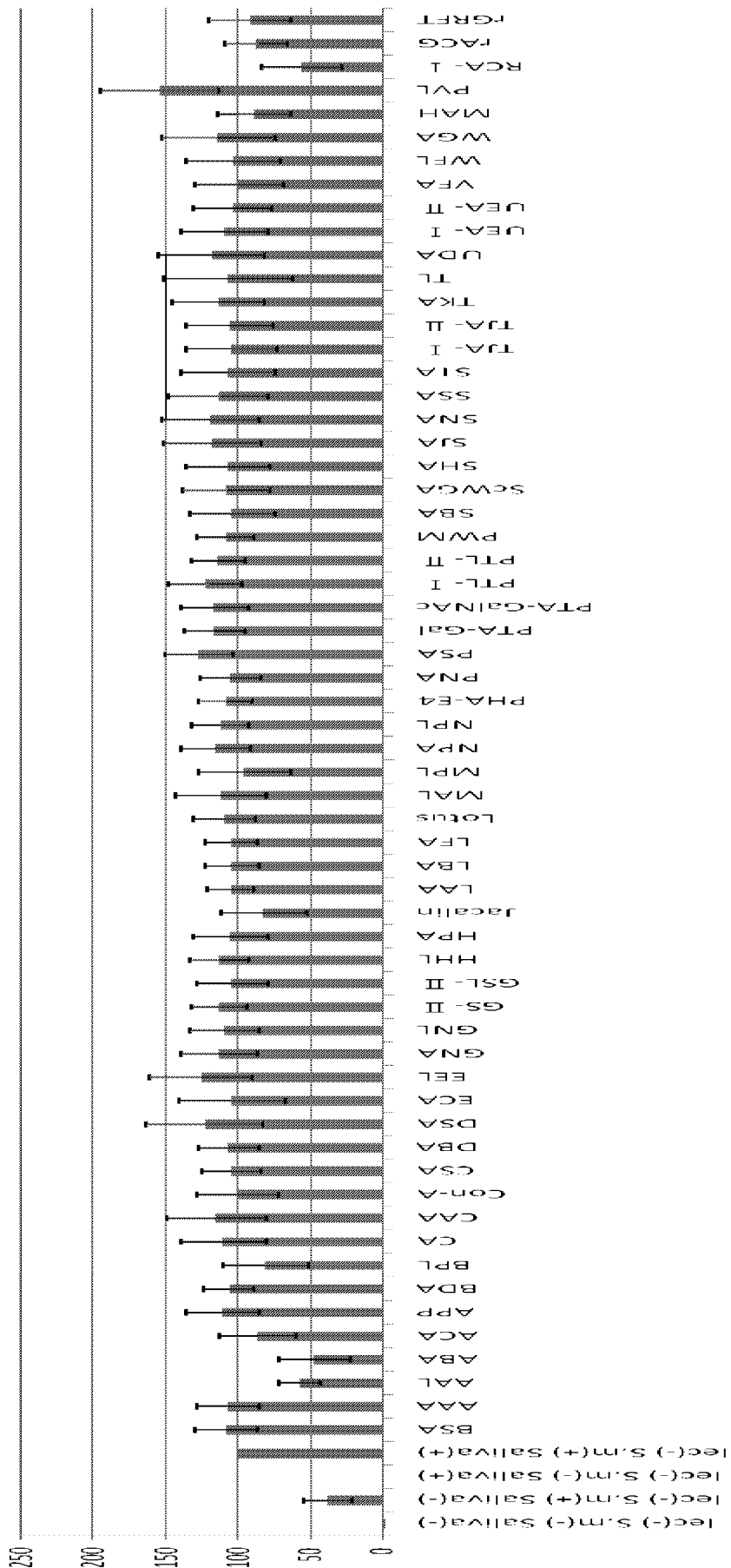
[図5]



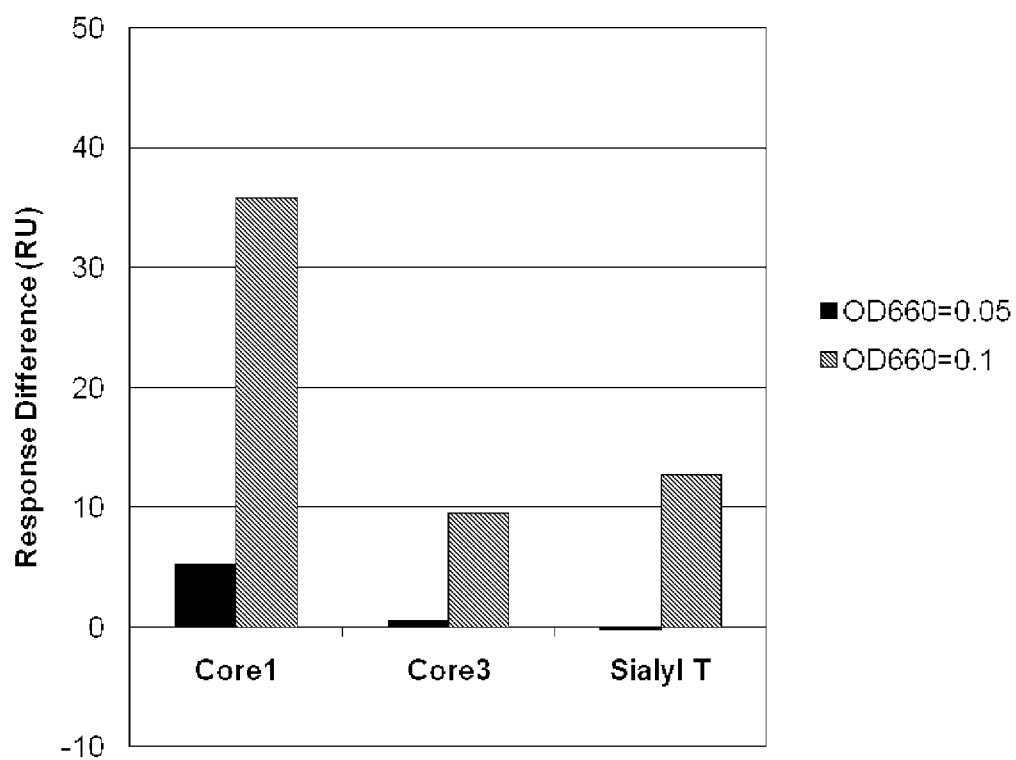
[7]



8



[図9]

*S.mutans*と糖鎖の相互作用

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/067903

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K38/00(2006.01) i, A61K8/64(2006.01) i, A61P1/02(2006.01) i, A61Q11/00(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) A61K38/00, A61K8/64, A61P1/02, A61Q11/00		
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 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 4217341 A (The University of Louisville), 12 April 1980 (12.04.1980), entire text (Family: none)	1, 2, 4, 7, 9-12, 21, 22, 24, 27 3, 5, 6, 8, 23, 25, 26, 28
X A	STAAT, R.H. et al, Modification of in vitro adherence of Streptococcus mutans by plant lectins, Advances in experimental medicine and biology, 1978, Vol.107, p.639-47	1, 2, 4, 7, 9-12, 21, 22, 24, 27 3, 5, 6, 8, 23, 25, 26, 28
X A	TEIXEIRA, E.H. et al, In vitro inhibition of streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins, Journal of Applied Microbiology, 2006, Vol.101, No.1, p.111-116	1, 2, 4, 7, 9-12, 21, 22, 24, 27 3, 5, 6, 8, 23, 25, 26, 28
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 10 November, 2009 (10.11.09)		Date of mailing of the international search report 24 November, 2009 (24.11.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/067903

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 13-20

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 13 to 20 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions of claims 1, 2, 7, 9-12, 21, 22 and 27 are not novel, as disclosed in US 4217341 A, STAAT, R. H. et al, Advances in experimental medicine and biology, 1978, vol.107, p.639-47, or TEIXEIRA, E. H. et al., Journal of Applied Microbiology, 2006, vol.101, no.1, p.111-116. Therefore, the inventions have no special technical feature.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K38/00(2006.01)i, A61K8/64(2006.01)i, A61P1/02(2006.01)i, A61Q11/00(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 (IPC)) Int.Cl. A61K38/00, A61K8/64, A61P1/02, A61Q11/00		
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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2009年 日本国実用新案登録公報 1996-2009年 日本国登録実用新案公報 1994-2009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) CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
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 請求項の番号
X A	US 4217341 A (The University of Louisville) 1980.04.12, 全文 (ファミリーなし)	1, 2, 4, 7, 9-12 , 21, 22, 24, 27 3, 5, 6, 8, 23, 2 5, 26, 28
X A	STAAT, R. H. et al, Modification of in vitro adherence of Streptococcus mutans by plant lectins, Advances in experimental medicine and biology, 1978, Vol.107, p.639-47	1, 2, 4, 7, 9-12 , 21, 22, 24, 27 3, 5, 6, 8, 23, 2 5, 26, 28
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 10.11.2009	国際調査報告の発送日 24.11.2009	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 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) 川口 裕美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C 9829

C (続き) . 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 請求項の番号
X A	TEIXEIRA, E. H. et al, In vitro inhibition of streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins, Journal of Applied Microbiology, 2006, Vol. 101, No. 1, p. 111-116	1, 2, 4, 7, 9-12 , 21, 22, 24, 27 3, 5, 6, 8, 23, 25, 26, 28

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 1 3 - 2 0 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求項 1 3 - 2 0 は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則 39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

請求項 1, 2, 7, 9 - 1 2, 2 1, 2 2, 2 7に係る発明は、US 4217341 A、STAAT,R.H. et al, *Advances in experimental medicine and biology*, 1978, Vol.107, p.639-47 又は TEIXEIRA,E.H. et al, *Journal of Applied Microbiology*, 2006, Vol.101, No.1, p.111-116 に記載されており、新規性が認められないから、特別な技術的特徴を有しない。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。