

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4895552号  
(P4895552)

(45) 発行日 平成24年3月14日(2012.3.14)

(24) 登録日 平成24年1月6日(2012.1.6)

(51) Int. Cl.

F I

<b>C 0 7 J</b>	<b>63/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 J	63/00	C S P
<b>A 6 1 K</b>	<b>31/56</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	31/56	
<b>A 6 1 P</b>	<b>3/10</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	3/10	
<b>A 6 1 P</b>	<b>29/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	29/00	
<b>A 6 1 P</b>	<b>37/08</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	37/08	

請求項の数 3 (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2005-238053 (P2005-238053)  
 (22) 出願日 平成17年8月18日(2005.8.18)  
 (65) 公開番号 特開2007-51101 (P2007-51101A)  
 (43) 公開日 平成19年3月1日(2007.3.1)  
 審査請求日 平成20年8月12日(2008.8.12)

(73) 特許権者 899000057  
 学校法人日本大学  
 東京都千代田区九段南四丁目8番24号  
 (74) 代理人 100079108  
 弁理士 稲葉 良幸  
 (74) 代理人 100080953  
 弁理士 田中 克郎  
 (74) 代理人 100093861  
 弁理士 大賀 眞司  
 (72) 発明者 北中 進  
 東京都千代田区九段南四丁目8番24号  
 学校法人日本大学内  
 (72) 発明者 大根谷 章浩  
 東京都千代田区九段南四丁目8番24号  
 学校法人日本大学内

最終頁に続く

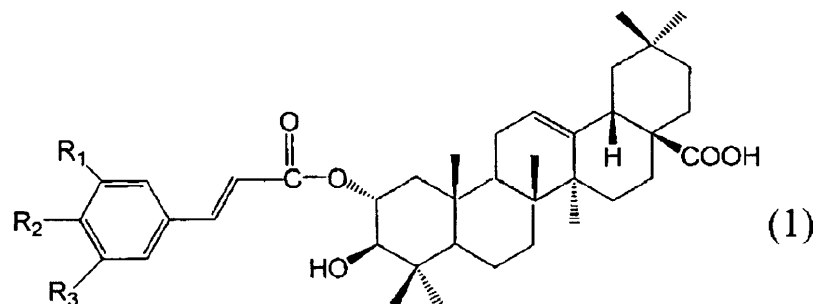
(54) 【発明の名称】 抗炎症化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記一般式(1)に示すトリテルペン誘導体。

【化1】



(1)

10

(上記式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 及び $R_3$ は同時に又は各々独立して水酸基、水素原子、 $C_{1-6}$ アルキル基又はアルキルエーテル基を意味する。)

【請求項2】

請求項1記載のトリテルペン誘導体、又は薬理的に許容される塩を有効成分とする、一酸化窒素産生抑制剤。

【請求項3】

請求項1記載のトリテルペン誘導体、又は薬理的に許容される塩を有効成分とする、

20

ラジカル消去剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は抗炎症効果を持つ化合物に係り、特に、沙棘から分離された抗炎症化合物に関する。

【背景技術】

【0002】

沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) は、グミ科の落葉低木で、主に中国黄河流域に多く自生する他、ヨーロッパ、旧ソ連、西アジア、中東など広範囲にも分布している。中国では、古くから沙棘の果実を喘息、消化不良、炎症などに利用されてきた。

【0003】

また、近年では、沙棘は、動脈硬化、狭心症、潰瘍、放射線傷害などにも応用されている。本植物の化学的成分には、果実、種子、茎と葉に含まれる、フラボノイド配糖体、ステロール、精油、トリテルペン誘導体があることが報告されている。薬理作用としては、血圧低下、抗動脈硬化、鎮咳、去痰、平喘、抗菌作用が知られている。

【0004】

例えば、特開2004-217545号公報には、沙棘由来でタンパク質非酵素的糖化抑制活性、アルドース還元酵素阻害活性及びフリーラジカル消去活性を示す新規なフラボノイド配糖体であって、糖尿病又は糖尿病合併症の予防・治療、老化や癌、動脈硬化、脳梗塞等の疾病の予防・治療に有効であることが記載されている。

【特許文献1】特開2004-217545号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

従来、沙棘に抗炎症効果があると知られていたものの、有効成分については未知であった。本発明は、沙棘由来の抗炎症効果を持つ化合物を明らかにするとともに、該化合物の新規用途を開発することを目的とするものである。

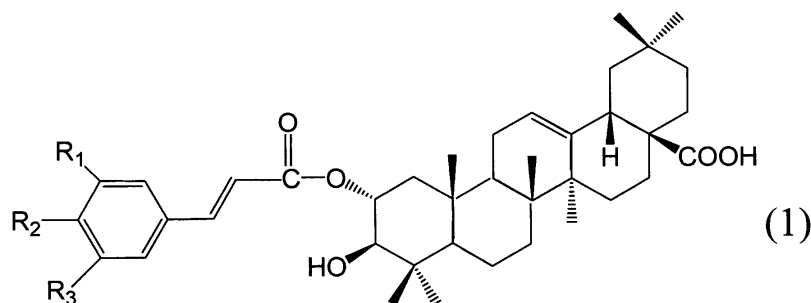
【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは沙棘由来の有効成分について鋭意検討を行った結果、抗炎症効果を有する化合物を明らかにするに至った。本発明はかかる知見に基づきなされたものであり、下記一般式(1)に示すトリテルペン誘導体を提供するものである。このトリテルペン誘導体、及び薬理的に許容される塩は、抗炎症作用(一酸化窒素産生抑制作用)、ラジカル消去作用を有している。

【0007】

【化1】



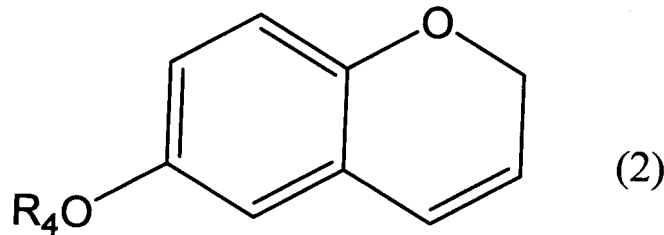
(上記式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 及び $R_3$ は同時に又は各々独立して水酸基、水素原子、 $C_{1-6}$ アルキル基又はアルキルエーテル基を意味する。)

【0008】

また、本発明は、下記一般式(2)に示すベンゾピラン誘導体、又は薬理的に許容される塩を有効成分とする、一酸化窒素抑制剤を提供するものである。このベンゾピラン誘導体、又は薬理的に許容される塩は、ラジカル消去作用をも有している。

【0009】

【化2】



10

(上記式中、 $R_4$  は水素原子、アルキル基、アシル基、糖類を意味する。)

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

上記一般式(1)に示すトリテルペン誘導体及び上記一般式(2)に示すベンゾピラン誘導体並びにこれらの薬理的に許容される塩は、抗炎症作用(一酸化窒素産生抑制作用)、ラジカル消去作用を有している。そのため、各種炎症性疾患、各種アレルギー性疾患、糖尿病等の治療に有効であると考えられる。

20

【0011】

新規トリテルペン誘導体及びベンゾピラン誘導体並びにそれらの薬理的に許容される塩を治療目的で使用するためには、各化合物及びその無毒性塩を有効成分とし、経口または非経口的に投与される。投与量は症状、年齢、性別、体重、投与形態等により異なるが、例えば成人に経口的に投与する場合には、通常1日量は0.1 - 1000 mgである。

【0012】

新規トリテルペン誘導体及びベンゾピラン誘導体並びにそれらの薬理的に許容される塩を製剤化するための剤型に制限はなく錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等の固形剤、溶液、懸濁液、乳剤などの液状製剤を経口的に、静脈内、筋肉内、皮下などの注射剤、坐剤、貼付剤などを非経口的に使用することができる。

30

【0013】

固形剤となす場合には澱粉、乳糖、グルコース、リン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、カルボキシメチルセルロースなどの賦形剤を用いることができ、必要であれば滑沢剤、崩壊剤、被覆剤、着色剤なども使用することができる。注射剤、及び液状製剤になす場合には安定化剤、溶液助剤、懸濁化剤、乳化剤、緩衝剤、保存剤などを含有させることができる。

【0014】

次に、上記一般式(1)にて示されるトリテルペン誘導体及び上記一般式(2)にて示されるベンゾピラン誘導体の製造例を説明する。

40

【0015】

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)の枝皮(3kg)を80%アセトン(10L)中に48時間浸漬して抽出物を得た。これを3回繰り返し、得られた抽出物を濃縮、乾固しエキス929.84gを得た。

【0016】

このエキス929.84gを水に溶かし、n-ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル、n-ブタノールで順次分配抽出し、減圧下濃縮してn-ヘキサン画分(21.14g)、クロロホルム画分(29.34g)、酢酸エチル画分(37.12g)、n-ブタノール

50

画分(180.23g)、水画分(631.73g)をそれぞれ得た。

【0017】

それぞれの画分について、サンプル濃度100 $\mu$ g/mLにおいて、後述する一酸化窒素(NO)産生抑制試験を行ったところ、それぞれn-ヘキサン画分(89.5%)、クロロホルム画分(90.3%)、酢酸エチル画分(67.2%)、ブタノール画分(24.6%)、水画分(0.8%)にNO産生抑制活性が認められた。

【0018】

続いて、それぞれの分画についてMTTアッセイを行い、そこで活性の一番強かったクロロホルム画分28.1gについて、シリカゲルカラム(wako gel C-300、6.5 $\times$ 18cm)に付し、n-ヘキサン、酢酸エチル:n-ヘキサン(2:98、4:96、8:92、15:85、20:80、40:60、80:20)、酢酸エチルおよびメタノールで順次溶出し、6つの画分fr.1(1.3g)、fr.2(1.0g)、fr.3(2.0g)、fr.4(1.5g)、fr.5(2.8g)、fr.6(12.2g)を得た。

10

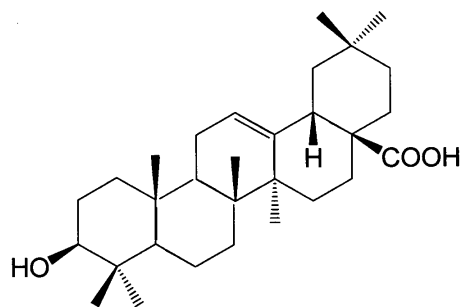
【0019】

次に、fr.3画分について順相のHPLC、カラムはShiseido Silica SG 80A 10 $\times$ 250mm、移動相はヘキサン:酢酸エチル70:30、流速4.0mL/min(室温)で溶出させ、保持時間8分20秒に溶出するピークをShodex RI-72(示差屈折計)を用いて分取した。この画分(230mg)を再び逆相のHPLCにより、カラムCapcell PAK C18 10 $\times$ 250mm、移動相はメタノール:水95:5、流速4.0mL/min(室温)で溶出させ、保持時間10分40秒に溶出するピークをUV(210nm)を用いて分取し、化合物1(24.9mg)を得た。下記に化合物1の構造式(3)を示す。

20

【0020】

【化3】



30

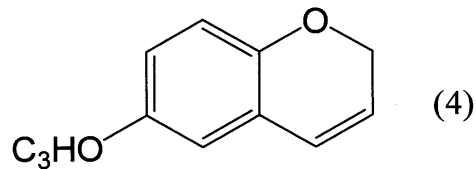
【0021】

fr.4画分についてODSカラム(Chromatorex ODS100-200 mesh、5.5 $\times$ 15cm)に付し、水:メタノール(50:50 0:100)で溶出し、9個(fr.4-1乃至fr.4-9)の画分を得た。このうち、fr.4-1(0.12g)について逆相のHPLC、カラムCapcell PAK C18 10 $\times$ 250mm、移動相はメタノール:水35:65、流速4.0mL/min(室温)で溶出させ、保持時間13分40秒に溶出するピークをUV(254nm)を用いて分取し、化合物3(12.8mg)を得た。下記に化合物2の構造式(4)を示す。

40

【0022】

## 【化4】



## 【0023】

以下に、得られた化合物の<sup>1</sup>H- 及び<sup>13</sup>C-NMRのデータ、MS、IR、UVのデータを示す。なお、化合物3及び4はVSRIAN Mercury 300により測定し、<sup>1</sup>H-NMRは300MHz、<sup>13</sup>C-NMRは75MHzにより測定した。

10

## 【0024】

## 【表1】

性状	黄色オイル
EI-MS (m/z)	163
分子量	162
分子式	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>
UV λ <sub>max</sub> nm (log ε)	275(3.42) 250(3.32)
IR(KBr) ν <sub>max</sub> cm <sup>-1</sup>	2960 1490 1205

20

## 【0025】

また、表2に、化合物2の<sup>1</sup>H-NMR及び<sup>13</sup>C-NMRデータ(300 MHz, in Chloroform-d)を示す。

## 【0026】

## 【表2】

Position	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>
2	4.43(dd, 0.6, 6.6)	58.9
3	5.75m	128.2
4	6.48m	130.0
4a		127.8
5	6.90m	113.1
6		145.0
7	6.71m	121.1
8	6.76m	110.2
8a		143.8
OCH <sub>3</sub>	3.88, s	55.0

40

## 【0027】

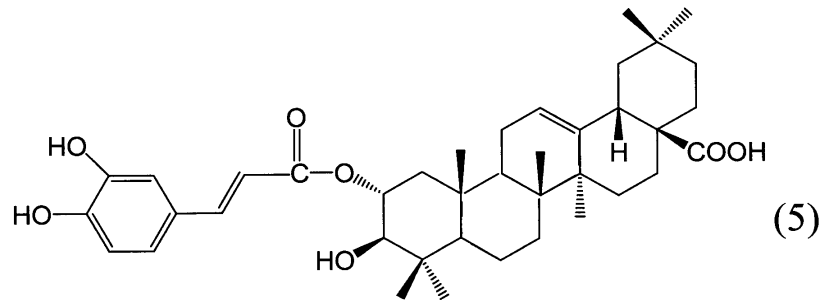
fr. 4-6 (0.07g) について順相のHPLC、カラムShiseido Silica SG 80A 10×250mm、移動相はヘキサン：酢酸エチル：アセトン60：35：5、流速4.0mL/min(室温)で溶出させ、保持時間11分13秒に溶出するピークを、UV(254nm)を用いて分取し、化合物3(6.0mg)を得た。

50

下記に化合物 3 の構造式 ( 5 ) を示す。

【 0 0 2 8 】

【 化 5 】



10

【 0 0 2 9 】

化合物 3 の性状に関するデータを表 3 に示す。なお、HR-FAB-MS ( $m/z$ ) の測定は JOEL GC mate を用いて行い、 $UV_{\max} \text{nm} (\log)$  の測定は Shimadzu UV-160 を用いて行い、 $IR_{\max}^{\text{cm}^{-1}}$  の測定は JASCO IR A-2 を用いて行った。

【 0 0 3 0 】

【 表 3 】

性状	無色粉末
HR-FAB-MS ( $m/z$ )	
計算値	633.38057
測定値	633.37912
分子量	634
分子式	$C_{39}H_{54}O_7$
UV $\lambda_{\max} \text{nm} (\log \epsilon)$	327(4.30) 300(4.26) 245(4.21)
IR $\nu^{\text{cm}^{-1}}_{\max}$	3430(OH) 1695 1515

20

30

【 0 0 3 1 】

また、化合物 4 の  $^1\text{H} - \text{NMR}$  及び  $^{13}\text{C} - \text{NMR}$  データ (600 MHz, in Methanol- $d_4$ ) を表 4 に示す。

【表4】

Position	$\delta H$	$\delta C$	Position	$\delta H$	$\delta C$
1	2.03m,1.00m	45.2	21	1.38m,1.20m	34.9
2	5.04(ddd,11.8,10.0,4.4)	73.8	22	1.36m,1.52m	33.8
3	3.24(d,10.0)	81.2	23	1.06s	29.2
4		41.0	24	0.88s	17.4
5	0.93m	56.6	25	1.09s	16.9
6	1.60m,1.48m	19.6	26	0.83s	17.7
7	1.72m,1.51m	33.8	27	1.17s	26.4
8		43.0	28		181.8
9	1.67m	49.1	29	0.89s	33.5
10		39.5	30	0.94s	24.0
11	1.98m,1.85m	24.6	1'		127.9
12	5.24(t,3.8)	123.4	2'	7.03(d,2.1)	115.2
13		145.3	3'		146.6
14		40.6	4'		149.5
15	1.78m	28.8	5'	6.77(d,8.6)	115.9
16	2.00m,1.60m	24.1	6'	6.93(dd,2.1,8.6)	122.8
17		47.6	7'	7.55(d,15.8)	146.8
18	2.84(dd,3.8,13.8)	42.7	8'	6.27(d,15.8)	116.5
19	1.66m, 1.12m	47.3	9'		169.3
20		31.6			

## 【0032】

## 【試験例1】NO産生抑制活性試験

化合物1～3をサンプルとして、下記の要領で一酸化窒素産生抑制活性試験を行った。各サンプルをDMSOに溶解した。別途、F-12HAM培地500mLにL-グルタミン(200mM)5mL、FBS50mLを加えた培地を調製し、該培地中のDMSOが0.2重量%になるように調製した。次に、コンフルエントになったRAW264.7細胞50mLを調製した培地に添加し、細胞懸濁液とした。この細胞懸濁液をFalconチューブに入れた。

## 【0033】

遠心器(1000rpm、3min、4)でRAW264.7細胞を遠沈し、上清をアスピレーターを用いて除いた。次いで上清を除いたFalconチューブに新鮮培地を20mL加え、懸濁することにより $1.5 \times 10^5$ 個/mLの濃度に調製した懸濁液を得た。そして、96穴プレート(住友ベークライト社製8096R)に上記懸濁液を200 $\mu$ Lずつ分注し、1時間、CO<sub>2</sub>インキュベーターにて細胞を密着させた。

## 【0034】

インキュベート後、96穴プレートにLPS(10 $\mu$ g/mL、Sigma社製O55:B5)2 $\mu$ Lとmouse INF- $\gamma$ (33ng/mL、Genzyme社製)2 $\mu$ L及び化合物溶液0.4 $\mu$ Lを加えた。これを16時間、CO<sub>2</sub>インキュベーターにて培養し、培養上清100 $\mu$ Lを採取した。

## 【0035】

これに、0.1%ナフチルジアミン溶液50 $\mu$ Lとスルファニルアミド溶液50 $\mu$ Lを加え、室温にて10分間遮光して放置後、分光光度計にてOD<sub>570nm</sub>(対照655nm)で測定した。細胞生存率(Cell viability)については、鏡検による観察とMTT法により判定した。

10

20

30

40

50

$$\text{抑制率 (\%)} = \{ 1 - (X - Y) / (Z - Y) \} \times 100$$

X : 試験化合物の存在下でIFN- $\gamma$  とLPSにより誘導されるNO<sub>2</sub><sup>-</sup>の量

Y : 試験化合物、IFN- $\gamma$  及びLPSがない状態で誘導されるNO<sub>2</sub><sup>-</sup>の量

Z : IFN- $\gamma$  とLPSにより誘導されるNO<sub>2</sub><sup>-</sup>の量

更に、算出した値から、サンプル化合物によるNO産生抑制率が50%阻害された濃度 (IC<sub>50</sub>) を求めた。細胞生存率 (Cell viability) の結果と併せて表5に示す。なお、表中、「A」はNO産生抑制率(%)を意味し、「B」は細胞生存率(%)を意味する。

評価基準

【0036】

【表5】

10

サンプル	100 $\mu$ M		30 $\mu$ M		10 $\mu$ M		3 $\mu$ M	
	A	B	A	B	A	B	A	B
化合物1	85	96	21	100	18	99	—	—
化合物2	85	95	50	99	28	100	—	—
化合物3	99	96	89	97	53	99	22	101

【0037】

【試験例2】ラジカル消去活性試験

20

化合物1~3をサンプルとして、Okadaらの方法に基づきラジカル消去活性試験を行った。96穴プレート(住友ベークライト社製、#8096R)に0.2M酢酸緩衝液(pH5.5)40 $\mu$ L、12%含水エタノール溶液120 $\mu$ L、ジメチルスルホキシドで溶解した試験化合物0.4 $\mu$ Lを加えた後、0.5mM DPPH溶液40 $\mu$ Lを加えて暗所で30分間放置した。その後、プレートリーダー(Bio-Rad社製3550プレートリーダー)により520nmの吸光度を測定した。そして、得られた測定値につき、下記計算式を用いてDPPHラジカルの消去率を算出した。更に、算出した値から、サンプル化合物によるラジカル消去活性が50%阻害された濃度(IC<sub>50</sub>)を求め、結果を表6に示した。

$$\text{消去率 (\%)} = \{ 1 - (X - Z) / (Y - Z) \} \times 100$$

30

X : 試験化合物を添加したときの吸光度

Y : 試験化合物を添加していないときの吸光度

Z : ジメチルスルホキシドと12%エタノール溶液のみの吸光度

【0038】

【表6】

サンプル	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
化合物1 (比較例1)	> 100
化合物2 (実施例1)	55.0
化合物3 (実施例2)	34.7

40



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 39/06	(2006.01)	A 6 1 P 39/06	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 36/18	(2006.01)	A 6 1 K 35/78	C
C 0 7 D 311/58	(2006.01)	C 0 7 D 311/58	
A 6 1 K 31/352	(2006.01)	A 6 1 K 31/352	

審査官 岡部 佐知子

- (56)参考文献 特開2004-217545(JP,A)  
 独国特許出願公開第10215055(DE,A1)  
 特開2002-037797(JP,A)  
 特開平07-061998(JP,A)  
 国際公開第2005/123649(WO,A1)  
 特表2008-505886(JP,A)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 J 6 3 / 0 0  
 A 6 1 K 3 1 / 5 6  
 A 6 1 P 3 / 1 0  
 A 6 1 P 2 9 / 0 0  
 A 6 1 P 3 7 / 0 8  
 A 6 1 P 3 9 / 0 6  
 A 6 1 P 4 3 / 0 0  
 A 6 1 K 3 1 / 3 5 2  
 A 6 1 K 3 6 / 1 8  
 C 0 7 D 3 1 1 / 5 8  
 C A p l u s ( S T N )  
 R E G I S T R Y ( S T N )  
 W P I