

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4639055号
(P4639055)

(45) 発行日 平成23年2月23日(2011.2.23)

(24) 登録日 平成22年12月3日(2010.12.3)

(51) Int.Cl.	F 1
C 0 7 H 1 5 / 0 4 (2 0 0 6 . 0 1)	C 0 7 H 1 5 / 0 4 E
A 6 1 K 3 1 / 7 0 3 2 (2 0 0 6 . 0 1)	A 6 1 K 3 1 / 7 0 3 2
A 6 1 P 1 / 0 0 (2 0 0 6 . 0 1)	A 6 1 P 1 / 0 0
A 6 1 P 3 9 / 0 2 (2 0 0 6 . 0 1)	A 6 1 P 3 9 / 0 2

請求項の数 3 (全 9 頁)

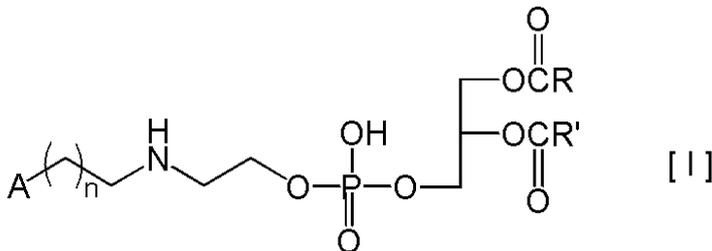
(21) 出願番号 特願2004-150488 (P2004-150488)	(73) 特許権者 000173924 公益財団法人野口研究所 東京都板橋区加賀 1-8-1
(22) 出願日 平成16年5月20日 (2004.5.20)	(72) 発明者 三浦 剛 千葉県銚子市明神町 1-169-1 グラ ンデニューカースル 305号室
(65) 公開番号 特開2005-330232 (P2005-330232A)	(72) 発明者 稲津 敏行 神奈川県小田原市飯田岡 165
(43) 公開日 平成17年12月2日 (2005.12.2)	(72) 発明者 森 裕志 岐阜県岐阜市岩井 380-85
審査請求日 平成19年5月10日 (2007.5.10)	(72) 発明者 横山 慎一郎 岐阜県岐阜市上土居 4-4-18 メゾン ときわ 301号室
特許法第30条第1項適用 平成16年3月30日 社 団法人日本薬学会主催の「日本薬学会第124年会」に おいて文書をもって発表	
最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ペロ毒素中和剤としてのスフィンゴ糖脂質類似体

(57) 【特許請求の範囲】

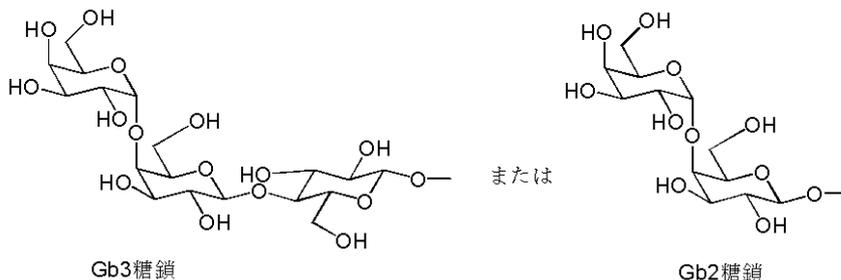
【請求項 1】

下記式 [I] で示されるスフィンゴ糖脂質類似体。



10

(式中、n は 1 ~ 3 の整数を示し、R , R ' はアルキル基を示し、A は下記の



20

を示す。)

【請求項2】

nが1、RとR'がC₁₅H₃₁である請求項1記載のスフィンゴ糖脂質類似体。

【請求項3】

請求項1または請求項2記載のスフィンゴ糖脂質類似体を含むペロ毒素中和剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はペロ毒素を中和するスフィンゴ糖脂質類似体に関する。さらに詳しくはペロ毒素中和作用を有するスフィンゴ糖脂質Gb3-セラミド類似体およびGb2-セラミド類似体に関する。

10

【背景技術】

【0002】

O-157を代表とする腸管出血性大腸菌が産生するペロ毒素は、赤痢菌由来志賀毒素と相同性の高いA B₅ファミリーに属するタンパク毒素であり、Stx-1とStx-1よりも強い毒性を示すStx-2の2つに大別される。ペロ毒素はヒトの細胞表面に存在するGb3-セラミドやGb2-セラミドなどのスフィンゴ糖脂質を認識、接着することによって細胞内に進入し、その毒性を発現する。スフィンゴ糖脂質Gb3-セラミドとGb2-セラミドの構造中で、ペロ毒素が認識する重要な部分構造は糖鎖部分であるのは周知の事実である(例えば、非特許文献1参照)。そこで、Gb3糖鎖またはGb2糖鎖を利用して、ペロ毒素の接着過程を効果的に阻害し、ペロ毒素を中和する物質に関する研究開発が精力的に行われてきた(例えば、特許文献1、特許文献2、非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4等参照)。

20

【0003】

しかしながら、未だ医療現場で利用できるペロ毒素の特効薬は開発されるに至っておらず、腸管出血性大腸菌に対する効果的な治療法は見いだされていない。前述の中和剤のほとんどはStx-1をよく中和できるものの、より毒性の強いStx-2を中和する能力は乏しい。これらの中和剤はポリマー(高分子樹脂)にGb3糖鎖またはGb2糖鎖を固定化したものや、Gb3糖鎖またはGb2糖鎖をデンドリマー化したものであり、本来のペロ毒素受容体(Gb3-セラミドおよびGb2-セラミド)が持つ2本鎖脂質部分はペロ毒素の結合に一定の関与が推測されてきたにもかかわらず、これまでの中和剤創製では考慮されてこなかった。

30

【特許文献1】特開2004-107230号公報

【特許文献2】特開2003-73391号公報

【非特許文献1】J. Biol. Chem.誌、262巻、1779頁、1987年

【非特許文献2】The Journal of Infectious Diseases誌、189巻、360頁、2004年

【非特許文献3】Nature誌、403巻、669頁、2000年

【非特許文献4】Organic Letters誌、4巻、355頁、2002年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の目的は、ペロ毒素中和活性を有し、腸管出血性大腸菌感染症の治療に臨床応用が可能なスフィンゴ糖脂質類似体を提供することである。

40

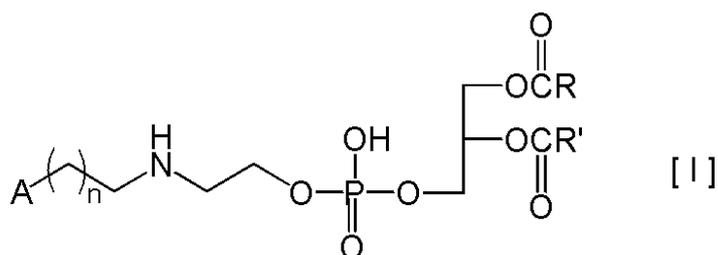
【課題を解決するための手段】

【0005】

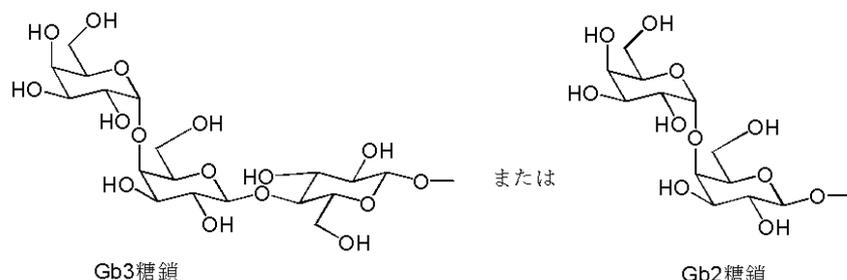
上記課題を解決するために、本発明者らは、スフィンゴ糖脂質Gb3-セラミドおよびGb2-セラミドの二本鎖脂質部分に注目し鋭意検討した結果、セラミドの代用ユニットとして、ホスファチジルエタノールアミンを用いた類似体を合成し、本発明に到達した。

【0006】

すなわち、本発明は下記一般式[1]で表されるスフィンゴ糖脂質類似体およびこの化合物を含むペロ毒素中和剤である。



(式中、 n は 1 ~ 3 の整数を示し、 R , R' はアルキル基を示し、 A は下記の、



を示す。)

【発明の効果】

【0007】

より毒性の強いベロ毒素Stx-2にも有効である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

式[1]中、 R , R' は同一又は異なったアルキル基を示すが、炭素数 1 ~ 20 の直鎖または分岐鎖のアルキル基が好ましく、このうち炭素数 12 ~ 18 がより好ましく、炭素数 15 が特に好ましい。例えば、トリデカニル基、ヘプタデカニル基、ペンタデカニル基などが挙げられる。

n は 1 ~ 3 の整数を示すが、1 が好ましい。

A はベロ毒素認識部分である Gb3 糖鎖または Gb2 糖鎖を示すが、Gb3 糖鎖がより好ましい。

【0009】

本発明の化合物はそれ自体公知の類似方法によって製造でき、どのような方法によっても構わないが、例えば図 1 に示した合成法を一例としてあげる事が出来る。

図 1 において、出発原料である化合物 1 は例えば文献既知の方法により合成できる(特開 2004-99507、特開 2004-99504、Tetrahedron Letters 誌、44 巻、1819 頁、2003 年参照)

。この化合物 1 を有機溶媒中、オゾン酸化することによって、化合物 2 を製造し、さらに有機溶媒中、還元剤の存在下、化合物 2 をホスファチジルエタノールアミンと縮合することによって化合物 3 を製造することが出来る。化合物 3 の糖鎖の保護基を還元によって除去することによって、本発明のスフィンゴ糖脂質類似体を製造できる。

【0010】

オゾン酸化反応では、有機溶媒中、オゾンを経過した後に、還元試薬を加えることによって、化合物 2 を製造できる。

反応に用いる有機溶媒は、周知の溶媒を使用できる。メタノール、エタノール、プロパノールなどを挙げることができるが、メタノールが好ましい。また、これらの混合物や含水物、あるいは不均一系での反応ができることは言うまでもない。

反応温度は室温 ~ -100 であるが、-50 ~ -100 が好ましい。反応時間は 5 分 ~ 5 日であるが、通常、10 分 ~ 24 時間である。

オゾン処理後に用いる還元剤としてジメチルスルフィド、トリフェニルホスフィン、チオ硫酸ナトリウムなどを挙げることができるが、ジメチルスルフィドが好ましい。

【0011】

縮合反応では化合物 2 を有機溶媒中、還元剤の存在下、ホスファチジルエタノールアミ

10

20

30

40

50

ンと反応させることによって化合物 3 を製造できる。

反応に用いる有機溶媒は、周知の溶媒を使用できる。クロロホルム、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、メタノール、エタノール、プロパノール、ジメトキシエタン、ジオキサン、テトラヒドロフラン、ベンゼン、トルエンなどを挙げることができる。また、これらの混合物や含水物、あるいは不均一系での反応ができることは言うまでもない。

反応に用いる還元剤は、周知の還元剤を使用できる。水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4)、シアノ水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_3CN)、ボラン (BH_3)、パラジウムカーボン (Pd-C) と水素ガス、水酸化パラジウム ($\text{Pd}(\text{OH})_2$) と水素ガス、ギ酸アンモニウム-パラジウムカーボン (Pd-C) などを挙げることができる。

反応温度は $-20 \sim 200$ であるが、 $50 \sim 80$ が好ましい。反応時間は 5 分 ~ 10 日であるが、通常、1 ~ 24 時間である。

10

【0012】

脱保護反応として、化合物 3 を有機溶媒中、触媒の存在下、水素ガスと反応させて還元することによって、化合物 4 を製造できる。

化合物 4 を製造する際に用いる、有機溶媒、反応時間については何ら制限はなく、具体的には化合物 3 で表される中間体の製造について述べた例と同じである。

反応に用いる還元条件は、周知の還元条件を使用できる。パラジウムカーボン (Pd-C) と水素ガス、水酸化パラジウム ($\text{Pd}(\text{OH})_2$) と水素ガス、ギ酸アンモニウム-パラジウムカーボン (Pd-C) などを挙げることができる。

反応温度は $-20 \sim 100$ であるが、室温が好ましい。

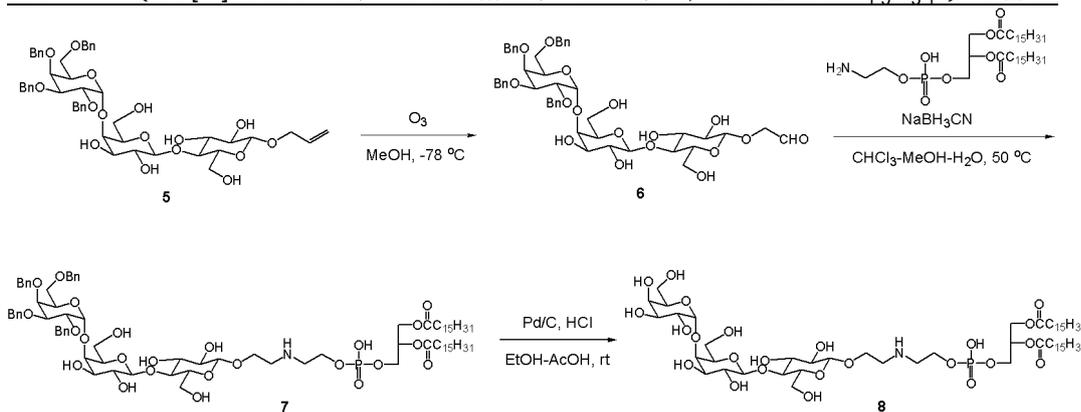
20

以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、その要旨を超えない限り、何ら制限を受けるものではない。

【実施例 1】

【0013】

Gb3-PEDP (式 [1] において、A が Gb3 糖鎖、n が 1、R, R' がともに $\text{C}_{15}\text{H}_{31}$) の合成



30

【0014】

化合物 6

化合物 5 (208mg, 0.23mmol) のメタノール (10ml) 溶液に -78 で、オゾンを経過し、次にオゾン臭がなくなるまで窒素をバブリングした。ジメチルスルフィド (0.5ml) を加え、徐々に室温に戻しながら 5 時間攪拌した後、反応液を濃縮し化合物 6 (209mg) を得た。

40

化合物 7

化合物 6 (78.3mg, 0.086mmol) のクロロホルム (5ml)、メタノール (8ml)、水 (0.5ml) 溶液中に、ホスファチジルエタノールアミンジパルミトイル (180mg, 0.26mmol) を加え、50 で 2 時間攪拌した。室温まで冷却した後、シアノ水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_3CN) (163mg, 2.6mmol) を加え 50 でさらに 2 時間攪拌した。反応液を LH-20 カラム クラマトグラフィー (クロロホルム:メタノール=1:1) にて脱塩し、続いてシリカゲル クラマトグラフィー (solv. クロロホルム:メタノール:水=8:2:0.1) にて精製し、化合物 7 (56.4mg, 41% 2steps) を白色粉末として得た。

50

化合物 8

化合物 7 (19.8mg, 12.5 μ l) のエタノール (6ml)、酢酸 (1ml) 混合溶液中、10% Pd/C (20mg) と 4M の塩酸ジオキササン溶液 (10 μ l) を加えた後、水素雰囲気下、室温で 6 日間攪拌した。次に反応液をろ過し、ろ液を濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (solv. クロロホルム:メタノール:水=7:3.5:0.1) にて精製し、化合物 8 (6.1mg, 40%) を白色粉末として得た。

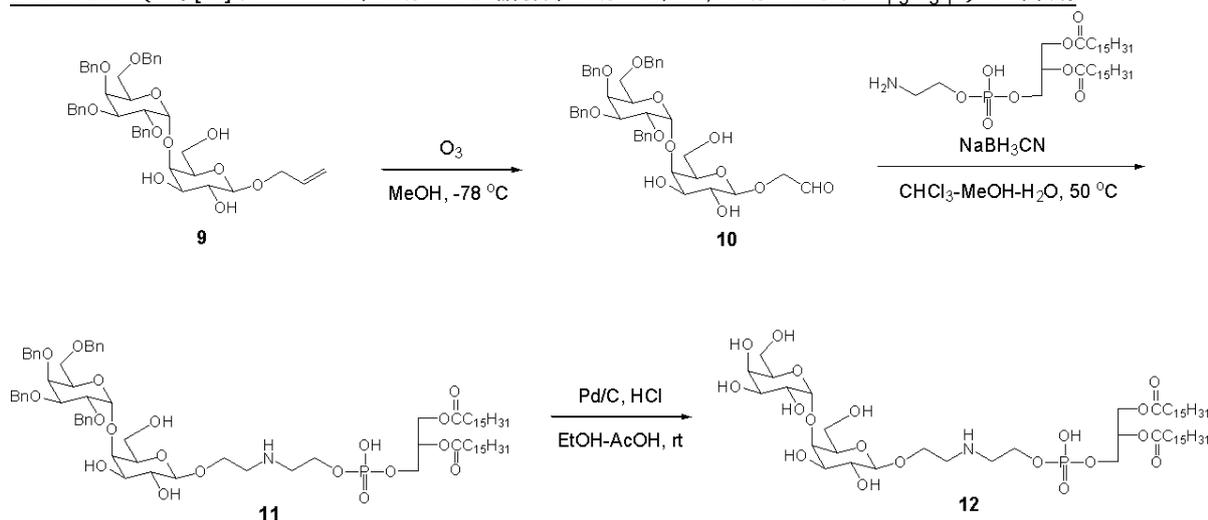
$[\alpha]_D^{20} = 26.1^\circ$ (c=0.83 in $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=1:1$)

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}=1:1$): δ 0.89 (t, J=7.1Hz, 6H), 1.27 (m, 48H), 1.61 (m, 4H), 2.33 (q, J=7.6Hz, 4H), 3.30 (m, 4H), 3.48 (m, 1H), 3.57 (m, 4H), 3.71 (m, 3H), 3.85 (m, 9H), 4.02 (m, 3H), 4.17 (m, 5H), 4.38 (d, J=7.8Hz, 1H), 4.43 (m, 2H), 4.97 (d, J=3.4Hz, 1H), 5.24 (m, 1H).

MALDI-TOF-MS: Calcd for $\text{C}_{57}\text{H}_{108}\text{NO}_{24}\text{PNa}$ (M+Na⁺): 1244.7, Found: 1243.2.

【実施例 2】**【0015】**

Gb2-PEDP (式 [1] において、A が Gb2 糖鎖、n が 1、R, R' がともに $\text{C}_{15}\text{H}_{31}$) の合成

**【0016】**化合物 10

化合物 9 (58.6mg, 0.079mmol) のメタノール (5ml) 溶液に -78 °C で、オゾンを経過し、反応液が青白くなったら、オゾン臭がなくなるまで窒素をバブリングした。ジメチルスルフィド (0.2ml) を加え、徐々に室温に戻しながら 30 時間攪拌した後、反応液を濃縮し化合物 10 (60.4mg) を得た。無色油状物。

化合物 11

化合物 10 (60.4mg, 0.079mmol) のクロロホルム (3ml)、メタノール (5ml)、水 (0.6ml) 溶液中に、ホスファチジルエタノールアミンジバルミトイル (167.9mg, 0.243mmol) を加え、50 °C で 2 時間攪拌した。室温まで冷却した後、シアノ水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_3CN) (155.2mg, 2.46mmol) を加え 50 °C でさらに 2 時間攪拌した。反応液を LH-20 カラムクロマトグラフィー (クロロホルム:メタノール=1:1) にて脱塩し、続いてシリカゲルクロマトグラフィー (solv. クロロホルム:メタノール:水=9:1.5:0.1) にて精製し、化合物 11 (59.6mg, 53% 2steps) を白色粉末として得た。

$[\alpha]_D^{20} = 22.3^\circ$ (c=1.27 in $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=1:1$)

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}=1:1$): δ 0.89 (t, J=7.1Hz, 6H), 1.27 (m, 48H), 1.61 (m, 4H), 2.31 (q, J=7.3Hz, 4H), 3.25 (m, 4H), 3.42 (dd, J=9.6, 5.6Hz, 1H), 3.53 (m, 3H), 3.63 (m, 1H), 3.73-4.19 (m, 13H), 4.29 (m, 2H), 4.42 (m, 1H), 4.49 (d, J=12.7Hz, 1H), 4.54 (d, J=11.5Hz, 1H), 4.75 (m, 3H), 4.86 (m, 2H), 4.94 (d, J=3.4Hz, 1H), 5.24 (m, 1H), 7.33 (m, 20H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}=1:1$): δ 14.39, 23.24, 25.46, 25.50, 29.69, 29.70

, 29.89, 29.94, 30.09, 30.12, 30.22, 30.27, 32.50, 34.61, 34.75, 48.08, 60.98, 61.34, 63.07, 64.41(J=5.0Hz), 65.23, 69.40, 70.87(J=8.3Hz), 71.16, 72.11, 73.07, 73.91, 74.01, 74.90, 75.07, 75.31, 75.47, 76.70, 79.35, 80.22, 100.88, 104.12, 127.90, 128.11, 128.19, 128.27, 128.46, 128.51, 128.68, 128.70, 128.86, 128.88, 128.90, 128.93, 138.18, 138.19, 138.70, 138.82, 173.92, 174.29.

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{79}H_{122}NO_{19}PH$ ($M+H^+$): 1421.8, Found: 1421.3; Calcd for $C_{79}H_{122}NO_{19}PNa$ ($M+Na^+$): 1442.8, Found: 1443.1; Calcd for $C_{79}H_{122}NO_{19}PK$ ($M+K^+$): 1459.9, Found: 1458.8.

化合物 1 2

化合物 1 1 (25.2mg, 17.7 μ l) のエタノール(7ml)、酢酸(1ml)混合溶液中、10%Pd/C(30 mg)と4Mの塩酸ジオキサン溶液(5 μ l)を加えた後、水素雰囲気下(10気圧)室温で3日間攪拌した。次に反応液をろ過し、ろ液を濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(solv. クロロホルム:メタノール:水=7:3:0.4)にて精製し、化合物 1 2 (9.5mg, 51%)を白色粉末として得た。

$[\alpha]_D^{25} = 21.8^\circ$ (c=0.34 in $CHCl_3$:MeOH =1:1)

1H NMR (400MHz, $CDCl_3$: CD_3OD =1:1): δ 0.89(t, J=7.1Hz, 6H), 1.28(m, 48H), 1.63(m, 4H), 2.34(q, J=7.6Hz, 4H), 3.29(m, 4H), 3.57(m, 2H), 3.67(m, 2H), 3.72(dd, J=11.7, 4.6Hz, 1H), 3.83(m, 6H), 3.95(d, J=2.7Hz, 1H), 4.01(m, 3H), 4.18(m, 4H), 4.34(d, J=6.6Hz, 1H), 4.43(dd, J=12.2, 3.2Hz, 1H), 4.98(d, J=3.7Hz, 1H), 5.26(m, 1H).

^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$: CD_3OD =1:1): δ 14.34, 23.24, 25.47, 25.51, 29.70, 29.72, 29.90, 29.94, 30.10, 30.13, 30.23, 30.25, 30.27, 32.51, 34.63, 34.77, 48.15, 60.83, 61.15, 62.32, 63.11, 64.39(J=4.7Hz), 64.98, 69.71, 70.33, 70.43, 70.91(J=7.5Hz), 71.83, 72.40, 73.77, 75.29, 79.45, 101.90, 103.93, 174.02, 174.41.

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{51}H_{98}NO_{19}PNa$ ($M+Na^+$): 1082.6, Found: 1081.1.

【実施例 3】

【0017】

ペロ毒素中和活性試験

本発明の[実施例 1]で合成した化合物 8 (Gb3-PEDP)および[実施例 2]で合成した化合物 1 2 (Gb2-PEDP)のペロ毒素に対する中和活性はHeLa細胞を用いて評価した。Gb3-PEDPおよびGb2-PEDPはジメチルスルホキシド(DMSO)に2mMに溶解し、さらに10mM phosphate buffered saline(PBS、pH7.4)で所要濃度(最終濃度:0.1~10 μ M)に希釈した。ペロ毒素(Stx-1およびStx-2)は-80℃に保存し、HeLa細胞へ添加した際の最終濃度が50%傷害活性を示す濃度(1 x CD_{50} 単位/ml)となるようにPBSにて20単位/mlに用時希釈して以下の試験に供した。

培養液は、4mM L-glutamine(キシダ化学、大阪)、0.1mg/ml streptomycin(明治製薬、東京)、100 U/ml Penicillin(明治製薬)、10%非働化(56℃、30分間)Fetal calf serum(FCS、Irvine Scientific、CF、USA)、および1.6% $NaHCO_3$ を含むDulbeccos' modified Eagle medium(DMEM、ニッスイ製薬、東京)とした。

HeLa細胞を培養液に懸たくし、 5×10^3 cells/wellとなるよう96穴プレート(Nunc、Roskilde、Denmark)に播種し、5% CO_2 下、37℃で24時間培養(Napco model 6300 CO_2 incubator、Tualatin、OR、USA)した後、180 μ l/wellの新鮮培養液に置換した。前述のように希釈したペロ毒素とGb3-PEDPまたはGb2-PEDP溶液を等量混合してあらかじめ1時間37℃でインキュベートし、その20 μ l/wellを培養HeLa細胞に添加して48時間培養を継続した。コントロールはGb3-PEDPまたはGb2-PEDPの代わりにPBSをペロ毒素に混じたものとした。この場合のDMSOの最終濃度は0.5%以下となり、予備検討の結果0.5%以下のDMSOではHeLa細胞の増殖には影響はみられなかった。

培養終了後、培養液を10% Alamar Blue(Trek diagnostic systems Inc.、OH、USA)/Hanks液(日水製薬)200 μ l/wellに置換し、2時間インキュベート後、還元されたAlamar Blueの蛍光強度(Ex: 530nm、Em:590nm)をCytoFlour™ 2350 fluorescence measurement

10

20

30

40

50

system (Millipore) により測定し、蛍光強度をもって生細胞数とした。

【 0 0 1 8 】

化合物 8 (Gb3-PEDP) および化合物 1 2 (Gb2-PEDP) のペロ毒素に対する中和活性についての成績を図 2 に示す。ペロ毒素を加えないで培養した場合の細胞数 (N) に比較して Stx-1 を添加して培養した場合の細胞数 (Control) は図 2 -A に示すように約 50% に減少した。これに対して 10 μ M の Gb3-PEDP または Gb2-PEDP の添加は Stx-1 による細胞数の減少を有意に抑制し、Gb3-PEDP および Gb2-PEDP は明らかに Stx-1 による細胞傷害の中和活性を示した。また、図 2 -B に示すように、Stx-2 を添加した Control では細胞数は約 25% に減少し、これに対して 0.1 - 10 μ M の Gb3-PEDP または Gb2-PEDP の添加は、Stx-2 による細胞数の減少を有意に抑制した。したがって、本発明の化合物 8 (Gb3-PEDP) および化合物 1 2 (Gb2-PEDP) は Stx-1 および Stx-2 のいずれのペロ毒素に対しても中和活性を示し、Stx-1 に比較して毒性の強い Stx-2 を特に強力に中和できることが明らかである。

10

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 1 9 】

本発明のスフィンゴ糖脂質誘導体は容易に入手可能なホスファチジルエタノールアミンを合成困難なセラミドの代用ユニットとして用いて合成できる。効果的に 2 種類のペロ毒素 (Stx-1、Stx-2) を中和でき、ペロ毒素の特効薬として期待される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 0 】

【 図 1 】 本発明化合物の合成法の概略。

20

【 図 2 】 ペロ毒素の HeLa 細胞傷害活性に対する化合物 8 (Gb3-PEDP) および化合物 1 2 (Gb2-PEDP) の中和活性。(A) は Stx-1 に対する中和活性、(B) は Stx-2 に対する中和活性を検討した結果である。

【 符号の説明 】

【 0 0 2 1 】

図 2 において

N : ペロ毒素も中和剤も加えない場合の細胞数

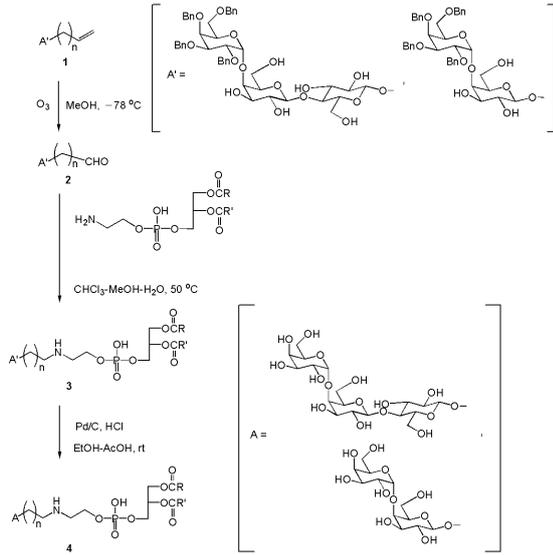
Control : ペロ毒素 (Stx-1 あるいは Stx-2) を加え、中和剤を加えない場合の細胞数

Gb2-PEDP : [実施例 2] で合成した本発明の化合物 (化合物 1 2) をペロ毒素 (Stx-1 あるいは Stx-2) に混合・添加した場合の細胞数

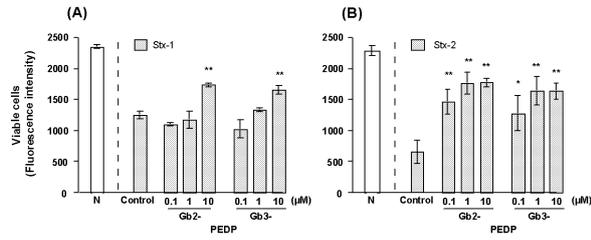
30

Gb3-PEDP : [実施例 1] で合成した本発明の化合物 (化合物 8) をペロ毒素 (Stx-1 あるいは Stx-2) に混合・添加した場合の細胞数

【 1 】



【 2 】



フロントページの続き

(72)発明者 梶本 哲也

京都府京都市山科区御陵四丁野町1 京都薬科大学内

審査官 瀬下 浩一

(56)参考文献 戸谷 一英 等, ラクトシルセラミドをミミックしたネオ糖脂質の設計と合成, 日本糖質学会年会要旨集, 2003年, Vol.24th, Page.31

三浦 剛 等, フルオラス糖鎖合成法によるスフィンゴ糖脂質Gb3糖鎖の合成, 日本化学会講演予稿集, 2002年, Vol.81st, No.2, Page.722, 3 A2-05

古田 有希 等, Gb3脂質アナログを用いたベロ毒素(Stx-I, -II)と糖鎖の結合挙動の解析, 日本糖質学会年会要旨集, 2001年, Vol.22nd, Page.94

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07H 15/04

A61K 31/7032

A61P 1/00

A61P 39/02

CAplus/REGISTRY(STN)

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)