



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I679981 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 12 月 21 日

(21)申請案號：104101315

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 01 月 15 日

(51)Int. Cl. : A61K35/62 (2006.01)

A61P25/16 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

(30)優先權：2014/01/20 日本

2014-007845

(71)申請人：日商井石有限公司 (日本) WELL STONE CO. (JP)

日本

(72)發明人：石井陽一 ISHII, YOICHI (JP)；根本隆行 NEMOTO, TAKAYUKI (JP)；岡本猛
OKAMOTO, TAKESHI (JP)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

TW 201235044A1

CN 102675468A

WO 2006/082609A1

審查人員：張榮興

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：4 共 29 頁

(54)名稱

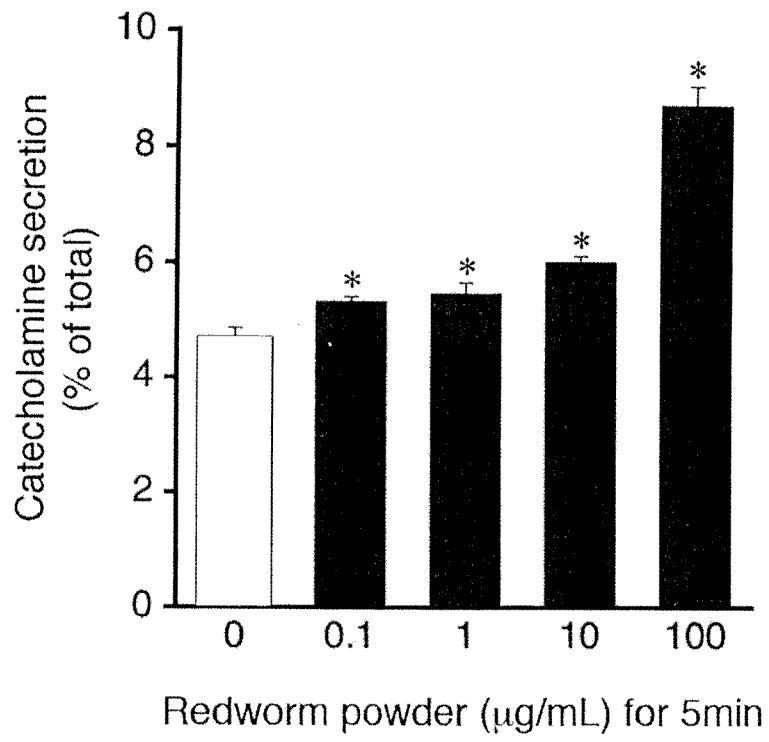
兒茶酚胺產生促進劑，起因於兒茶酚胺的缺乏之疾病的治療藥・預防藥及治療用・預防用食品組成物

(57)摘要

本發明提供一種將天然物作為有效成分含有之兒茶酚胺產生促進劑，起因於缺乏兒茶酚胺之疾病的治療藥・預防藥，起因於缺乏兒茶酚胺之疾病的治療用・預防用食品組成物。將蚯蚓的乾燥粉末、磨碎物及/或萃取物作為有效成分含有之兒茶酚胺產生促進劑，起因於缺乏兒茶酚胺之疾病的治療藥・預防藥，起因於缺乏兒茶酚胺之疾病的治療用・預防用食品組成物。起因於前述缺乏兒茶酚胺之疾病係選自阿滋海默氏病及帕金森氏病所成群較佳。

指定代表圖：

圖 1



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

兒茶酚胺產生促進劑，起因於兒茶酚胺的缺乏之疾病的治療藥・預防藥及治療用・預防用食品組成物

【技術領域】

[0001] 本發明係關於兒茶酚胺產生促進劑，起因於缺乏兒茶酚胺之疾病的治療藥・預防藥，起因於缺乏兒茶酚胺之疾病的治療用・預防用食品組成物。

【先前技術】

[0002] 兒茶酚胺係具有兒茶酚與胺的化合物，在生體內作為一部分的神經傳達物質存在。在生體內最豐富地含有兒茶酚胺係腎上腺素、甲腎上腺素及多巴胺，該等由酪氨酸轉換。酪氨酸轉換成 L-DOPA(L-3,4-二羥基苯丙氨酸)，進而，L-DOPA 轉換成多巴胺。又，甲腎上腺素由多巴胺轉換，腎上腺素由甲腎上腺素轉換。

[0003] 阿滋海默氏病或帕金森氏病等神經變性疾病中，確認了兒茶酚胺缺乏，實用化或研究經由兒茶酚胺之產生促進的預防或治療。例如作為抗帕金森氏病藥，服用成為腎上腺素、甲腎上腺素及多巴胺的前驅體之苯丙氨酸、酪氨酸或 L-DOPA。又，為了防止起因於經由單胺氧化酵素之胺基氧化去除的代謝，作為抗帕金森氏病藥使用

單胺氧化酵素阻害藥。關於阿滋海默氏病，近年來變成主要進行藥物治療，目前未發現根本的治療藥。然而，檢討著甲腎上腺素、多巴胺的重要性，又，阿滋海默氏病模型鼠中，亦報告甲腎上腺素之組織內濃度的減少(非專利文獻 1~4)，期待經由兒茶酚胺的產生促進之阿滋海默氏病的預防或治療法的開發。

[0004] 另一方面，自古以來在東方國家蚯蚓萃取物或蚯蚓乾燥粉末主要作為各種疾病之預防劑、治療劑使用，至今為止已知作為膀胱內結石縮小劑及排出促進劑、黃疸治療劑、分娩促進劑、強壯劑、育毛劑、強精劑、解熱劑、吸引治療劑、血行促進劑、半身不遂治療劑、間接鎮痛劑、排尿劑、支氣管哮喘劑、高血壓症治療劑的用途。

但是，至今為止將蚯蚓作為有效成份之在兒茶酚胺產生促進劑或阿滋海默氏病或帕金森氏病之預防・治療沒有利用蚯蚓的報告例。

[先前技術文獻]

[非專利文獻]

[0005]

[非專利文獻 1]

Francis BM et al., Neuropsychopharmacology (2012)
37: 1934-1944

[非專利文獻 2]

Szot P, Epilepsia (2012) 53 (Suppl.1): 61-66

[非專利文獻 3]

Xu Y et al., Progress in Neurobiology (2012) 97 : 1-13

[非專利文獻 4]

Robertson IH, Neurobiology of Aging (2013) 34 : 298-308

【發明內容】

[發明所欲解決之課題]

[0006] 思及在阿滋海默氏病或帕金森氏病等之神經變性疾病的治療伴隨長期間之藥劑投予，特別必要安全且副作用少藥劑，需求來自天然物之兒茶酚胺產生促進劑並阿滋海默氏病及帕金森氏病的預防・治療藥。

[0007] 於是，本發明之目的在於提供將天然物作為有效成分含有之兒茶酚胺產生促進劑，起因於缺乏兒茶酚胺之疾病的預防・治療劑，起因於缺乏兒茶酚胺之疾病症狀的改善用食品組成物及改善用醫藥用組成物。

[解決課題之手段]

[0008] 亦即，本發明之兒茶酚胺產生促進劑，其特徵為含有蚯蚓的乾燥粉末、磨碎物及/或萃取物作為有效成分。

[0009] 本發明之起因於缺乏兒茶酚胺之疾病的治療藥或預防藥，其特徵為含有前述兒茶酚胺產生促進劑。

[0010] 本發明之起因於缺乏兒茶酚胺之疾病的治療用或預防用之食品組成物，其特徵為含有前述兒茶酚胺產生促進劑。

[0011] 本發明之起因於缺乏兒茶酚胺之疾病的治療藥或預防藥，為前述起因於缺乏兒茶酚胺之疾病係選自阿滋海默氏病及帕金森氏病所成群較佳。

[0012] 本發明之起因於缺乏兒茶酚胺之疾病的治療用或預防用之食品組成物，為起因於前述缺乏兒茶酚胺之疾病係選自阿滋海默氏病及帕金森氏病所成群較佳。

[0013] 本發明之兒茶酚胺產生促進劑之製造方法，其特徵為使用蚯蚓的乾燥粉末、磨碎物或萃取物。

[0014] 本發明之起因於缺乏兒茶酚胺之疾病的治療藥或預防藥之製造方法，其特徵為使用蚯蚓的乾燥粉末、磨碎物或萃取物。

[0015] 本發明之起因於缺乏兒茶酚胺之疾病的治療用或預防用食品組成物之製造方法，其特徵為使用蚯蚓的乾燥粉末、磨碎物或萃取物。

[0016] 本發明之兒茶酚胺之產生促進方法，其特徵為使用蚯蚓的乾燥粉末、磨碎物及/或萃取物。

[0017] 本發明之蚯蚓的乾燥粉末、磨碎物或萃取物，使用於因缺乏兒茶酚胺之疾病的治療。

[0018] 本發明之起因於缺乏兒茶酚胺之疾病的治療方法或預防方法，其特徵為將蚯蚓的乾燥粉末、磨碎物及/或萃取物以有效量投予對象者。

[發明效果]

[0019] 根據本發明，可提供將天然物作為有效成分含有之兒茶酚胺產生促進劑，起因於缺乏兒茶酚胺之疾病的預防・治療劑，起因於缺乏兒茶酚胺之疾病的症狀之改善用食品組成物及改善用醫藥用組成物。

【圖式簡單說明】

[0020]

圖 1 為表示藉由含有蚯蚓乾燥粉末的牛腎上腺髓質嗜鉻細胞之兒茶酚胺的分泌量變化之圖表。橫軸表示蚯蚓乾燥粉末的濃度。縱軸表示兒茶酚胺的分泌量。蚯蚓乾燥粉末 $0\mu\text{g/mL}$ 、5 分鐘時的細胞內兒茶酚胺量作為 100%。

圖 2 為表示藉由含有蚯蚓乾燥粉末的牛腎上腺髓質嗜鉻細胞之細胞內鈣濃度變化的照片圖表。

圖 3 為表示藉由含有蚯蚓乾燥粉末的牛腎上腺髓質嗜鉻細胞之細胞內鈣的螢光強度變化之圖表。橫軸表示蚯蚓乾燥粉末的濃度。縱軸表示螢光強度。蚯蚓乾燥粉末 $0\mu\text{g/mL}$ 群組的螢光強度設為 100%。

圖 4 為表示藉由調查含有蚯蚓乾燥粉末的牛腎上腺髓質嗜鉻細胞之酪胺酸羥化酵素的磷氧化變化之西方氏轉漬法的結果之照片圖表。

【實施方式】

[0021] 本發明中，使用於原料之蚯蚓沒有特別限制，例如可使用紅蚯蚓 (*Lumbricus rubellus*)、LT 蚯蚓 (*Lumbricus terrestris*)、赤子愛勝蚯蚓 (*Eisenia foetida*)、縞蚯蚓 (*Allolobophora caliginosa*)、八毛蚯蚓 (*Dendrobaena octaedra*)、櫻蚯蚓 (*Allolobophora japonica* Michaelson)、*Drawida hattamimizu* Hatai、背黑蚯蚓 (*Pheretima divergens* Michaelson)、普通蚯蚓 (*Pheretima communissima*)、田地蚯蚓 (*Pheretima agrestis*)、一紋蚯蚓 (*Pheretima sieboldi* Horst)、一紋蚯蚓 (*Pheretima hilgendorfi*)、湖濱蚯蚓 (*Pontodrilus matsushimensis* Iizuka)、系蚯蚓 (*Tubifex hattai* Nomura)、[*Limnodrilus gotoi* Hatai=*L. Socialis* Stephenson] 等。

[0022] 本發明中蚯蚓的乾燥粉末意指，乾燥未處理或經前處理之蚯蚓的磨碎物或萃取物而得到的粉末。又，蚯蚓之磨碎物意指，磨碎未處理或經前處理的蚯蚓之液狀者或漿狀者。蚯蚓之萃取物意指，將未處理或經前處理蚯蚓或其磨碎物溶解於水、水溶液或有機溶媒、不溶性級分去除或分離而得到之提取。並非特別限制前述前處理，可列舉後述之污物等的去除處理等。又，蚯蚓的乾燥粉末、磨碎物及萃取物亦可進行後處理，作為後處理可列舉造粒、過濾、精製、濃縮、稀釋及 pH 調整等。

[0023] 沒有特別限制欲得到蚯蚓之磨碎物的磨碎方法，例如使用均質機、混合器、均相攪拌機、搗潰機、加壓型細胞破壞裝置等而可磨碎。

[0024] 沒有特別限制欲得到蚯蚓之萃取物的萃取方法，例如將蚯蚓的乾燥粉末或磨碎物溶解於萃取溶媒，去除或分離不溶性級分而可萃取。作為萃取溶媒可列舉水、水溶液，以及乙醇、丙酮及乙酸乙酯等有機溶媒、可單獨 1 種或組合 2 種以上即可。其中，水、乙醇或乙醇水溶液較佳。

[0025] 沒有特別限制欲得到蚯蚓之乾燥物的乾燥方法，藉由冷凍乾燥、加熱乾燥及噴霧乾燥等乾燥方法可進行乾燥。其中，藉由後述理由冷凍乾燥較佳。

[0026] 本發明中蚯蚓的乾燥粉末、磨碎物或萃取物，係視其目的調配有效量即可。雖適當調配量依存目的、投予途徑與形態、蚯蚓的乾燥粉末等製造方法等之種種因素，但去除後述之殘留在蚯蚓消化管內的消化物、附著在表皮的污物等之後，換算成經冷凍乾燥的磨碎蚯蚓、磨碎物而得到的蚯蚓之乾燥粉末重量，將起因於兒茶酚胺缺乏之疾病的預防或輕度的疾病治療作為目的時，較佳為每一天 1~15000 mg，更佳為每一天 12~1800mg，特佳為每一天 120~180 mg。又，起因於兒茶酚胺缺乏為重度的疾病治療作為目的時，佳為每 1 天 1~15000 mg，更佳為每 1 天 18~3600 mg，特佳為每一天 180~360 mg。

[0027] 沒有特別限制本發明之兒茶酚胺產生促進劑、治療藥、預防藥及食品組成物的形狀，固態、粉末、半固態及液體之任一者均可。

[0028] 本發明中可直接使用蚯蚓的乾燥粉末、磨碎

物或萃取物。又，特別是本發明中之兒茶酚胺產生促進劑、治療藥及預防藥，亦可包含藥學上可接受之載體，例如作為片劑、顆粒劑、散劑、膠囊劑、軟膠囊劑、液劑、注射劑、栓劑、緩釋劑等、可經口地或非經口地(例如靜脈投予、直接投予於患部等)投予。作為藥學上可接受之載體，可使用賦形劑、結合劑、崩解劑、流動化劑、滑澤劑、塗佈劑、助懸劑、著色劑、甜味劑或界面活性劑等，依習知方法可設為一般的醫藥製劑形態。又，亦可包含其他治療、預防成分或藥學上可接受之添加劑。

[0029] 又，本發明中特別是本發明的兒茶酚胺產生促進劑及食品組成物，係亦可包含通常使用在食品的添加劑。可使用例如賦形劑、結合劑、崩解劑、流動化劑、滑澤劑、塗佈劑、助懸劑、著色劑、甜味劑或界面活性劑等，依習知方法可設為一般食品組成物的形態。又，亦可包含其他食品或來自食品成分。

[0030] 本發明中蚯蚓的乾燥粉末、磨碎物及萃取物之中，就製造步驟之保存穩定性的觀點而言，使用蚯蚓的乾燥粉末較佳。亦可使蚯蚓的乾燥粉末予以溶解及／或分散於水等液體之後，與藥學上及／或使用於食品之通常的載體、添加劑等其他成分混合。

[0031] 雖在本發明沒有特別限制起因於缺乏兒茶酚胺之疾病，選自阿滋海默氏病與帕金森氏病所成群較佳。

[0032] 欲將蚯蚓作為原料進行經口投予，而去除殘留在蚯蚓消化管內的消化物、附著在表皮的污物等較佳。

本發明中沒有特別限制去除方法，亦可使用習知的方法去除。可使用例如將蚯蚓生體浸漬在如鈉鹽或鉀鹽般之鹼鹽水溶液中，使消化管內的糞土排泄之方法(記載在特開平 1-47718 號公報、特開平 1-47719 號公報、特開平 1-47720 號公報及特開平 1-268639 號公報的方法)，於維持 6~26℃ 之酸水溶液中將蚯蚓生體放置 0.1~5 小時而去除消化管內的糞土之方法(記載在特開平 3-72427 號公報的方法)等。

[0033] 作為本發明之去除方法，使下述之金屬的氯化物及/或羥基羧酸與蚯蚓接觸之方法較佳。

[0034] 上述金屬的氯化物係由鉀、鈉、鎂及鈣所成群選出之至少 1 種金屬的氯化物。亦即，由氯化鉀、氯化鈉、氯化鎂及氯化鈣所成群選出之至少 1 種。又，亦可該等混合物，該等與可能可添加於食品中之其他無害成分的混合物。作為該等混合物可列舉例如食鹽、岩鹽、天日鹽。上述金屬的氯化物係藉由將粉末狀者撒在活蚯蚓而可使用，藉此引起蚯蚓與金屬的氯化物之接觸。

[0035] 使上述金屬的氯化物接觸活蚯蚓後，如下述活蚯蚓與羥基羧酸接觸較佳。又，亦可不接觸上述金屬的氯化物，如下述進行羥基羧酸與蚯蚓的接觸。

[0036] 關於與上述羥基羧酸的接觸，亦可藉由將粉末狀羥基羧酸撒在活蚯蚓上進行。又，亦可浸漬在 pH2~5 的羥基羧酸水溶液中。經由與金屬的氯化物之接觸後進行與羥基羧酸的接觸時，與上述金屬的氯化物之接觸後迅

速地進行與羥基羧酸的接觸較佳。又，活蚯蚓與羥基羧酸的接觸之前，水洗蚯蚓較佳。藉由水洗去除上述金屬的氯化物後使蚯蚓與羥基羧酸接觸時可得到酵素活性高的蚯蚓乾燥粉末。於接觸羥基羧酸之前進行水洗時，與金屬的氯化物開始接觸後，較佳為 30 分鐘以內，更佳為 20 分鐘以內進行水洗。沒有特別限制水洗方法，可採用習知方法。

[0037] 使活蚯蚓長時間與羥基羧酸接觸時會死亡，因為生活機能消失，消化道內的消化物無法排泄，所以儘可能迅速地以 30 秒以內為佳，以 20 秒以內更佳，經水稀釋羥基羧酸，調整成 pH2~5 之範圍。

[0038] 因羥基羧酸形成對蚯蚓不愉快的生活環境，所以活蚯蚓係藉由自我保存本能，放出體液、排泄物而改善生活環境。另外，因為羥基羧酸具有殺菌性，所以達成幫助如前述地促進消化器內殘留的消化物等排泄，並可期待將蚯蚓附著的雜菌進行殺菌的效果。

[0039] 上述方法中使用之結晶狀羥基羧酸係在使用條件下呈現結晶狀體即可，可與其羥基數或者羧基數無關地使用。亦即，單羥基單羧酸、單羥基多羧酸、多羥基單羧酸、多羥基多羧酸之任一者均可。

[0040] 作為本發明中使用之羥基羧酸，可列舉例如羥基乙酸、乳酸、乙酸、 β -羥基丙酸、 α -羥基正丁酸、 β -羥基正丁酸、 α -羥基正戊酸、 β -羥基正戊酸、蘋果酸、 α -甲基蘋果酸、 α -羥基戊二酸、 β -羥基戊二酸、檸檬酸、丙二酸及琥珀酸等。其中對於食品可

化，迅速地冷凍係較佳，但另一方面，使以過短時間冷凍時，蚯蚓糊主要成份之蛋白質與一同存在的雜質形成點狀不結凍部份，而不被分離，所以過度急速的冷凍並不適宜。因此，冷凍係以 -18°C 至 -35°C 之低溫，必要進行 20～240 小時，進行 50～170 小時更佳。

[0046] 冷凍乾燥之際，選擇可去除水份與雜質而不殘留之條件係重要的。因此，於壓力為 50Pa 以下， -60°C 至 $+90^{\circ}\text{C}$ 之溫度，邊階段地提高溫度下，邊控制於 10～60 小時之範圍進行較佳。

[0047] 作為冷凍乾燥的方法，例如將如前述磨碎物，以 -18°C 至 -35°C 之溫度，必要 20～240 小時進行冷凍後，於 -60°C 至 $+90^{\circ}\text{C}$ 之溫度，分數個階段進行升溫，於壓力為 25～40Pa，邊分數個階段減壓，邊冷凍真空乾燥進行 10～60 小時，可得到無菌狀態之淡黃色蚯蚓乾燥粉末。

[0048] 進而，具備將經冷凍乾燥之前述磨碎物溶解於水或乙醇水溶液，而去除或分離不溶性級分之步驟較佳。去除或分離不溶性級分之步驟，可與上述同樣地進行經由放置之沈澱、離心、過濾等。邊攪拌或振動邊進行溶解於水或乙醇水溶液的步驟較佳。溶解於水必要的時間較佳為 1～120 分鐘，更佳為 5～80 分鐘。雖乙醇水溶液的乙醇濃度沒有特別限制，但較佳為 10～70%(v/v)，更佳為 30～60%。

[0049] 本發明之兒茶酚產生促進劑、治療藥、預防

使用且從容易獲取並方便的角度考量，較佳為乳酸、乙酸、蘋果酸、檸檬酸、丙二酸及琥珀酸。羥基羧酸可單獨一種使用，亦可混合 2 種以上使用。

[0041] 活蚯蚓組織之 65% 為水份。作為活蚯蚓的保命機能運作的時間係留有某程度餘地，但若活蚯蚓死亡時酵素將運作，所以控制放置於不愉快生活環境下之時間必須謹慎進行。此時間係依條件而被左右，但通常為 3 ~ 180 分鐘之範圍。

[0042] 以羥基羧酸處理之蚯蚓活體係利用水洗淨後，磨碎成非液狀至漿狀之磨碎物。洗淨係以純水進行為宜。洗淨方法並無特別限制，可採用已知之水洗方法。另外，磨碎前之處理步驟之合計時間，亦即自灑下金屬氯化物於活蚯蚓至以水洗淨羥基羧酸結束的時間係以合計 240 分鐘以內為宜。

[0043] 前述的磨碎方法並無特別限制，例如使用勻化器、混合機、均質機、搗潰機、加壓型細胞破壞裝置，通常於 1 ~ 25℃ 進行。就抑制蚯蚓構成成份分解之觀點上，於低溫下進行為佳，以 2 ~ 15℃ 之溫度為較佳。

[0044] 由磨碎蚯蚓所得之磨碎物係收納於例如不銹鋼托盤，施以冷凍乾燥。此時蚯蚓活體所含的酵素雖不作用於活細胞，但因為對死細胞瞬間作用，有發生腐敗性氣體之虞，為防止此，以急速冷卻、冷凍成 -18℃ ~ -35℃，抑制酵素作用後，進行冷凍乾燥為較佳。

[0045] 如此地不損害蚯蚓原本的藥理作用而粉末

藥與食品組成物，係如上述將溶解於水或乙醇水溶液之上清液，可直接使用此狀態之水溶液，亦可去除水分作為濃縮液使用，可以使其乾燥以粉末狀使用。乾燥上清液後之粉末狀物溶解於水中亦可。又，蚯蚓糊狀物經凍結乾燥後之粉末，不溶解於水或乙醇水溶液直接使用亦可。

[0050] 又，本發明中作為去除方法，係將活蚯蚓放置於不快環境下處理之前，亦即使上述活蚯蚓與金屬的氯化物或羥基羧酸接觸之前，予以將活蚯蚓移動到如麵包箱一樣的平箱中，放置於明亮處 10~50 小時，去除附著於表皮之污物較佳。於明亮處之放置時間更佳為 12~24 小時。作為此時之收納量係蚯蚓堆疊為 30~60mm，以 40~50mm 之厚度之程度的量較佳。此平箱內，使如砂、泥之異物不存在，又，蚯蚓為夜行性，於黑暗處之生活活動變得活躍，有消耗體力之虞，所以夜晚以藉由電照培養方式等保持明亮較佳。藉由此操作之活蚯蚓，發揮其自我防禦本能，將消化管內殘留之消化物進行排泄，此排泄物會覆蓋全身，防止水分蒸發，而維持其生活環境，所以若此覆蓋之污物亦即排泄物用適當之手段返覆進行剝離，則最後可去除其消化管內之消化物以及附著於體皮之污物。

[0051] 附著於蚯蚓體皮的污物之剝離，例如可使用不織布覆蓋活蚯蚓，使污物吸附在不織布上。這在明亮處放置及去除附著於體皮之污物，藉由與金屬氯化物及/或羥基羧酸相接觸之組合，可更進一步期待蚯蚓體內有毒物之排出、去除。

[0052] 本發明中作為得到蚯蚓的乾燥粉末方法，特別是就乾燥粉末保存穩定性之觀點而言，下述方法較佳。

(A-1)具備使活蚯蚓與由鉀、鈉、鎂及鈣所成群選出之至少 1 種金屬的氯化物接觸，

之後，使粉末狀羥基羧酸與活蚯蚓接觸，經水稀釋調整成 pH2~5 之範圍，保持 3~180 分鐘後，水洗活蚯蚓並磨碎，將得到的磨碎物進行冷凍乾燥的步驟之蚯蚓的乾燥粉末之製造方法。

(A-2)具備使活蚯蚓與由鉀、鈉、鎂及鈣所成群選出之金屬的氯化物接觸，

之後，將活蚯蚓浸漬在經調整成 pH2~5 的羥基羧酸水溶液中，保持 3~180 分鐘後，水洗活蚯蚓並磨碎，將得到的磨碎物進行冷凍乾燥的步驟之蚯蚓的乾燥粉末之製造方法。

(A-3)前述(A-1)或(A-2)的步驟中，具備使經冷凍乾燥之前述磨碎物溶解於水或乙醇水溶液，去除或分離不溶性級分後，進而進行冷凍乾燥的步驟之蚯蚓的乾燥粉末之製造方法。

[0053] 又，將磨碎活蚯蚓所成磨碎物進行冷凍乾燥後，就乾燥物的殺菌之觀點而言，將得到的乾燥物以 110℃ 以上未達 130℃ 進行加熱處理較佳。加熱溫度未達 110℃ 時，有乾燥物的殺菌不充分的情形，130℃ 以上時包含在蚯蚓乾燥物之酵素失活而降低活性，故不佳。更佳為 115~125℃。沒有特別限制加熱方法，可列舉吹熱風的方

法、使用加熱夾套的方法、放置於托盤等而以加熱器加熱的方法、使用定溫恆溫器的方法等。加熱時間較佳為 30 秒～130 分鐘，更佳為 30 分鐘～90 分鐘，進而最佳為 60 分鐘～90 分鐘。加熱時間過短時，有會出現殺菌不充分的情況，加熱時間過長時，會失去酵素活性而不佳。尚且，由於對液體中的酵素進行上述加熱處理則會失去酵素活性，所以本發明中使用蚯蚓的乾燥粉末較佳。

[0054] 本發明中作為得到蚯蚓之磨碎物的方法係下述方法較佳。

(B-1)具備使活蚯蚓與由鉀、鈉、鎂及鈣所成群選出至少 1 種金屬的氯化物接觸，

之後，使粉末狀羥基羧酸與活蚯蚓接觸，以水稀釋使 pH 調整在 2～5，並且保持 3～180 分鐘，水洗活蚯蚓後進行磨碎之步驟的蚯蚓之磨碎物的製造方法。

(B-2)具備使活蚯蚓與由鉀、鈉、鎂及鈣所成群選出之金屬的氯化物接觸，

之後，將活蚯蚓浸漬在經調整成 pH2～5 的羥基羧酸水溶液中，並且保持 3～180 分鐘，水洗活蚯蚓後進行磨碎之步驟的蚯蚓之磨碎物的製造方法。

[0055] 本發明中作為得到蚯蚓之萃取物的方法係下述方法較佳。

(C-1)具備使活蚯蚓與由鉀、鈉、鎂及鈣所成群選出之至少 1 種金屬的氯化物接觸，

之後，使粉末狀羥基羧酸與活蚯蚓接觸，以水稀釋使

pH 調整在 2~5，並且保持 3~180 分鐘，水洗活蚯蚓後進行磨碎，將經冷凍乾燥而得到的磨碎物溶解於水或乙醇水溶液，去除或分離不溶性級分之步驟的蚯蚓之萃取物的製造方法。

(C-2)具備使活蚯蚓與由鉀、鈉、鎂及鈣所成群選出之金屬的氯化物接觸，

之後，將活蚯蚓浸漬在經調整成 pH2~5 的羥基羧酸水溶液中，並且保持 3~180 分鐘，水洗活蚯蚓後進行磨碎，將經冷凍乾燥而得到的磨碎物溶解於水或乙醇水溶液，去除或分離不溶性級分之步驟的蚯蚓之萃取物的製造方法。

[實施例]

[0056] 以下示出實施例進一步詳細地說明本發明，本發明不限制於下述實施例。尚且，以下，所示之份在沒有特別說明的情況下為全部指質量基準。

[0057]

[蚯蚓乾燥粉末的調製]

將放置在明亮場所 24 小時後已剝離表皮上附著之污染物的活紅蚯蚓 30kg，擴散在平皿上並使厚度約為 5cm，在其上均勻地撒上 250g 氯化鈉。20 分鐘後將蚯蚓進行水洗。然後，同樣地撒上 250g 檸檬酸之後以 15 秒鐘加入 30L 純水進行稀釋。此時在加水之後即刻的 pH 為 2.25，完全稀釋之後 pH 為 2.74。撒上檸檬酸粉末後，蚯蚓一口

氣釋放出黃色的體液。以水稀釋後，20 分鐘保持其狀態。之後，從污濁的檸檬酸水溶液取出活蚯蚓，經水洗後，用均質機在 10℃ 的條件下進行磨碎，從而製備蚯蚓糊狀物。之後，抽吸脫氣該蚯蚓糊狀物，去除其中含有的氣體後，將其轉移到不銹鋼製的托盤上，並瞬間驟冷到 -35℃，並在該溫度下維持 50 小時進行緩慢冷凍。將經冷凍之蚯蚓糊狀物以 -35℃ 將壓力 0Pa 保持 2 小時之後，升溫至 25℃ 之溫度為止，並在 40Pa 下乾燥 10 小時，之後在 40℃、壓力 35Pa 下乾燥 14 小時，以及隨後在 65℃、壓力 35Pa 下乾燥 12 小時，最後在溫度 80℃、壓力 25Pa 的條件下保持 6 小時，並由此進行真空冷凍乾燥。以此處理得到了含水量 8 質量%的淡黃色蚯蚓乾燥粉末。

[0058] 使用 RM-50D 型加熱裝置(大河原製作所股份有限公司製)將在上述得到之蚯蚓乾燥粉末進行加熱處理。加熱條件係花費 90 分鐘加熱至 120℃ 為止之後，在 120℃ 加熱 20 分鐘，花費 240 分鐘冷卻至 40℃ 為止之後，取出蚯蚓乾燥粉末。

使乙醇：冷凍乾燥粉末成為 20：1(v/w)之方式將經加熱處理之蚯蚓乾燥粉末溶解於 50%乙醇水溶液，在室溫(25℃)下以 1500rpm 振動 1 小時。之後，以 4℃、10000×g 離心 15 分鐘，分離上清，在 75℃ 減壓濃縮 15 分鐘。將得到之上清移至不銹鋼製的托盤上，並瞬間驟冷到 -35℃，在此溫度維持 50 小時緩慢冷凍。將經冷凍之蚯蚓糊狀物在 -35℃ 將壓力 0Pa 保持 2 小時之後，升溫至溫度 25

℃為止，在 40Pa 以 10 小時，之後在 40℃、壓力 35Pa 以 14 小時，之後在 65℃、壓力 35Pa 以 12 小時進行乾燥，藉由最後將溫度設為 80℃，壓力 25Pa 下保持 6 小時而進行真空冷凍乾燥，得到蚯蚓乾燥粉末 A-1。

[0059]

〔牛腎上腺髓質嗜鉻細胞培養〕

將藉由牛腎上腺髓質經單離之牛腎上腺髓質嗜鉻細胞在培養液中(37℃)培養 48 小時。尚且，由於腎上腺髓質嗜鉻細胞係胚胎學上來自神經嵴的細胞，所以有時作為神經細胞模型被利用的細胞。

[0060]

〔兒茶酚胺分泌測定〕

在上述得到的蚯蚓乾燥粉末 A-1 分別成為 0.01、1、10 及 100 μ g/mL 之方式，將在上述已培養之牛腎上腺髓質嗜鉻細胞(4×10^6 個：35mm 培養皿)的培養液取代為經溶解的 1mL 之 KRP 溶液(雷布斯林格氏磷酸緩衝溶液：Krebs-Ringer phosphate Buffer)，並且在 37℃ 培養 5 分鐘。僅將溶液從溶解有用於培養的蚯蚓乾燥粉末之 KRP 溶液採集 0.1ml，添加 0.1mL 之 0.2N 過氯酸與 0.2mL 之 3,4-二羥基苯胺(DHBA)，使用 HPLC(高效液相色譜)及 ESA 社製 Coulochem II (電化學檢測機)，求出兒茶酚胺的分泌量。又，將上述蚯蚓乾燥粉末 A-1 以 0 μ g/mL 在 37℃ 經培養 5 分鐘之牛腎上腺髓質嗜鉻細胞的細胞(4×10^6 個)內兒茶酚胺量作為 100%換算之結果示於圖 1。

[0061]

〔細胞內鈣濃度測定〕

將在上述已培養之牛腎上腺髓質嗜鉻細胞(4×10^6 個：35mm 培養皿)的培養液取代為以 $5 \mu\text{mol/mL}$ 之最終濃度使同人化學股份有限公司製 Fluo-4-AM 含有的 1mL 之 KRP 溶液，在 37°C 培養 30 分鐘。然後，將培養培養皿固定在螢光顯微鏡下回流裝置，將在上述得到的蚯蚓乾燥粉末 A-1 分別成為 0.1、10 及 $100 \mu\text{g/mL}$ 之方式，以經溶解之 KRP 溶液進行還流，從還流開始以 5 秒間隔進行照片記錄，而測定照片整體之螢光(488nm)強度尖峰時的螢光強度。將螢光強度尖峰時的照片示於圖 2，又，將蚯蚓乾燥粉末 A-1 為 $0 \mu\text{g/mL}$ 時的螢光強度尖峰時的螢光強度作為 100%進行比較之結果示於圖 3。

尚且，已知腎嗜鉻細胞與神經細胞之中細胞內鈣濃度的上升促進含兒茶酚胺之分泌囊泡的誘發(分泌囊泡的細胞膜融合)，而引起兒茶酚胺的分泌。

[0062]

〔酪胺酸羥化酵素的磷氧化〕

在上述得到的蚯蚓乾燥粉末 A-1 分別成為 0 及 $100 \mu\text{g/mL}$ 之方式，將在上述已培養之牛腎上腺髓質嗜鉻細胞(4×10^6 個：35mm 培養皿)的培養液取代為經溶解的 1mL 之 KRP 溶液(雷布斯林格氏磷酸緩衝溶液：Krebs-Ringer phosphate Buffer)，並且在 37°C 培養 5 分鐘。然後，以 PBS(-)溶液(4°C)洗淨細胞後迅速地僅採細胞(4×10^6

個)，藉由西方氏轉漬法檢測酪胺酸羥化酵素(Tyrosine Hydroxylase：TH)的磷氧化。將結果示於圖 4。

尚且，酪胺酸羥化酵素係兒茶酚胺之生合成的限速酵素，藉由細胞內鈣濃度的上升被磷氧化、被活性化。

[0063] 從圖 1 很明顯地得知，蚯蚓乾燥粉末較對照溶液(未含有蚯蚓乾燥粉末之 KRP 溶液)，有意地使兒茶酚胺的分泌量增加， $100\mu\text{g/mL}$ 時亦增加 85%。如從圖 2、圖 3 明顯地得知，蚯蚓乾燥粉末較對照溶液亦增加細胞內鈣。從圖 4 很明顯地得知，蚯蚓乾燥粉末使兒茶酚胺之生合成的限速酵素之酪胺酸羥化酵素的絲胺基酸殘基(19、31、40 番目)之磷氧化(pSer-TH)增加，表示活性上升。

At 100 $\mu\text{g/mL}$ 時亦增加 85%。

發明摘要

※申請案號：104101315

※申請日：104年01月15日

※IPC分類：

A61K 35/62 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

兒茶酚胺產生促進劑，起因於兒茶酚胺的缺乏之疾病的治療藥・預防藥及治療用・預防用食品組成物

● 【中文】

本發明提供一種將天然物作為有效成分含有之兒茶酚胺產生促進劑，起因於缺乏兒茶酚胺之疾病的治療藥・預防藥，起因於缺乏兒茶酚胺之疾病的治療用・預防用食品組成物。將蚯蚓的乾燥粉末、磨碎物及／或萃取物作為有效成分含有之兒茶酚胺產生促進劑，起因於缺乏兒茶酚胺之疾病的治療藥・預防藥，起因於缺乏兒茶酚胺之疾病的治療用・預防用食品組成物。起因於前述缺乏兒茶酚胺之疾病係選自阿滋海默氏病及帕金森氏病所成群較佳。

● 【英文】

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(1)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

第 104101315 號

民國 107 年 11 月 6 日修正

申請專利範圍

1. 一種阿滋海默氏病的治療藥或預防藥之製造方法，其係使用紅蚯蚓 (Lumbricus rubellus) 的乾燥粉末、水或乙醇水溶液之萃取物，及/或前述萃取物之乾燥粉末之阿滋海默氏病的治療藥或預防藥之製造方法，其特徵為，

具備使活的紅蚯蚓與由鉀、鈉、鎂及鈣所成群選出之至少 1 種金屬的氯化物接觸，

之後，使粉末狀羥基羧酸與活的紅蚯蚓接觸，經水稀釋調整成 pH2~5 之範圍，保持 3~180 分鐘後，水洗活的紅蚯蚓並磨碎，將得到之磨碎物經冷凍乾燥後溶解於水或乙醇水溶液，去除或分離不溶性級分的步驟。

2. 一種阿滋海默氏病的治療藥或預防藥之製造方法，其係使用紅蚯蚓 (Lumbricus rubellus) 的乾燥粉末、水或乙醇水溶液之萃取物，及/或前述萃取物之乾燥粉末之阿滋海默氏病的治療藥或預防藥之製造方法，其特徵為，

具備使活的紅蚯蚓與由鉀、鈉、鎂及鈣所成群選出之至少 1 種金屬的氯化物接觸，之後，將活的紅蚯蚓浸漬在經調整成 pH2~5 的羥基羧酸水溶液中，保持 3~180 分鐘後，水洗活的紅蚯蚓並磨碎，將得到之磨碎物經冷凍乾燥後溶解於水或乙醇水溶液，去除或分離不溶性級分的步驟。

3. 一種阿滋海默氏病的治療用或預防用食品組成物之製造方法，其係使用紅蚯蚓 (Lumbricus rubellus) 的乾燥粉末、水或乙醇水溶液之萃取物，及/或前述萃取物之乾燥

第 104101315 號

民國 107 年 11 月 6 日修正

粉末之阿滋海默氏病的治療用或預防用食品組成物之製造方法，其特徵為，

具備使活的紅蚯蚓與由鉀、鈉、鎂及鈣所成群選出之至少 1 種金屬的氯化物接觸，

之後，使粉末狀羥基羧酸與活的紅蚯蚓接觸，以水稀釋使 pH 調整在 2~5，並且保持 3~180 分鐘，水洗活的紅蚯蚓後進行磨碎，將得到之磨碎物經冷凍乾燥後溶解於水或乙醇水溶液，去除或分離不溶性級分之步驟。

4. 一種阿滋海默氏病的治療用或預防用食品組成物之製造方法，其係使用紅蚯蚓 (*Lumbricus rubellus*) 的乾燥粉末、水或乙醇水溶液之萃取物，及/或前述萃取物之乾燥粉末之阿滋海默氏病的治療用或預防用食品組成物之製造方法，其特徵為，

具備使活的紅蚯蚓與由鉀、鈉、鎂及鈣所成群選出之至少 1 種金屬的氯化物接觸，

之後，將活的紅蚯蚓浸漬在經調整成 pH2~5 的羥基羧酸水溶液中，保持 3~180 分鐘後，水洗活的紅蚯蚓並磨碎，將得到之磨碎物經冷凍乾燥後溶解於水或乙醇水溶液，去除或分離不溶性級分的步驟。

5. 一種用以製造阿滋海默氏病的治療藥或預防藥之使用，其係用以製造阿滋海默氏病的治療藥或預防藥之紅蚯蚓 (*Lumbricus rubellus*) 的乾燥粉末、水或乙醇水溶液之萃取物，及/或前述萃取物之乾燥粉末的使用，其特徵為前述紅蚯蚓的水或乙醇水溶液之萃取物及/或前述萃取物之乾

第 104101315 號

民國 107 年 11 月 6 日修正

燥粉末係以具備下述步驟之製造方法製造，該製造方法係具備使活的紅蚯蚓與由鉀、鈉、鎂及鈣所成群選出之至少 1 種金屬的氯化物接觸，

之後，使粉末狀羥基羧酸與活的紅蚯蚓接觸，以水稀釋使 pH 調整在 2~5，並且保持 3~180 分鐘，水洗活的紅蚯蚓後進行磨碎，將得到之磨碎物經冷凍乾燥後溶解於水或乙醇水溶液，去除或分離不溶性級分之步驟。

6. 一種用以製造阿滋海默氏病的治療藥或預防藥之使用，其係用以製造阿滋海默氏病的治療藥或預防藥之紅蚯蚓 (Lumbricus rubellus) 的乾燥粉末、水或乙醇水溶液之萃取物，及/或前述萃取物之乾燥粉末的使用，其特徵為前述紅蚯蚓的水或乙醇水溶液之萃取物及/或前述萃取物之乾燥粉末係以具備下述步驟之製造方法製造，該製造方法係具備使活的紅蚯蚓與由鉀、鈉、鎂及鈣所成群選出之至少 1 種金屬的氯化物接觸，

之後，將活的紅蚯蚓浸漬在經調整成 pH2~5 的羥基羧酸水溶液中，保持 3~180 分鐘後，水洗活的紅蚯蚓並磨碎，將得到之磨碎物經冷凍乾燥後溶解於水或乙醇水溶液，去除或分離不溶性級分的步驟。

7. 一種用以製造阿滋海默氏病的治療用或預防用之食品組成物之使用，其係用以製造阿滋海默氏病的治療用或預防用之食品組成物之紅蚯蚓 (Lumbricus rubellus) 的乾燥粉末、水或乙醇水溶液之萃取物，及/或前述萃取物之乾燥粉末的使用，其特徵為前述紅蚯蚓的乾燥粉末、水或乙醇

第 104101315 號

民國 107 年 11 月 6 日修正

水溶液之萃取物及/或前述萃取物之乾燥粉末係以具備下述步驟之製造方法製造，該製造方法係具備使活的紅蚯蚓與由鉀、鈉、鎂及鈣所成群選出之至少 1 種金屬的氯化物接觸，

之後，使粉末狀羥基羧酸與活的紅蚯蚓接觸，以水稀釋使 pH 調整在 2~5，並且保持 3~180 分鐘後，水洗活的紅蚯蚓後進行磨碎，將得到之磨碎物經冷凍乾燥後溶解於水或乙醇水溶液，去除或分離不溶性級分之步驟。

8. 一種用以製造阿滋海默氏病的治療用或預防用之食品組成物之使用，其係用以製造阿滋海默氏病的治療用或預防用之食品組成物之紅蚯蚓 (*Lumbricus rubellus*) 的乾燥粉末、水或乙醇水溶液之萃取物，及/或前述萃取物之乾燥粉末的使用，其特徵為前述紅蚯蚓的乾燥粉末、水或乙醇水溶液之萃取物及/或前述萃取物之乾燥粉末係以具備下述步驟之製造方法製造，該製造方法係具備使活的紅蚯蚓與由鉀、鈉、鎂及鈣所成群選出之至少 1 種金屬的氯化物接觸，

之後，將活的紅蚯蚓浸漬在經調整成 pH2~5 的羥基羧酸水溶液中，保持 3~180 分鐘後，水洗活的紅蚯蚓並磨碎，將得到之磨碎物經冷凍乾燥後溶解於水或乙醇水溶液，去除或分離不溶性級分的步驟。