

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7538530号
(P7538530)

(45)発行日 令和6年8月22日(2024.8.22)

(24)登録日 令和6年8月14日(2024.8.14)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	36/81 (2006.01)	A 6 1 K	36/81
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04
A 6 1 P	3/04 (2006.01)	A 6 1 P	3/04
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
請求項の数 3 (全15頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2020-531308(P2020-531308)	(73)特許権者	515135918
(86)(22)出願日	令和1年7月16日(2019.7.16)		再生ファーマ株式会社
(86)国際出願番号	PCT/JP2019/027870		大阪府守口市大久保町三丁目3 4 番 8 号
(87)国際公開番号	WO2020/017489	(74)代理人	110000914
(87)国際公開日	令和2年1月23日(2020.1.23)		弁理士法人W i s e P l u s
審査請求日	令和4年6月23日(2022.6.23)	(72)発明者	乾 利夫
(31)優先権主張番号	特願2018-133954(P2018-133954)		大阪府守口市金田町六丁目1 4 番 1 7 号
(32)優先日	平成30年7月17日(2018.7.17)	審査官	石井 裕美子
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 炎症性サイトカイン産生抑制剤

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

トマト抽出物を有効成分とする、マイクログリア細胞における炎症性サイトカイン産生抑制剤であって、
前記炎症性サイトカインがインターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-6（IL-6）、又は腫瘍壊死因子（TNF-α）であり、
前記トマト抽出物が、生トマトの搾汁液の分子量分画による分子量1万以上の画分である、抑制剤。

【請求項2】

請求項1に記載の炎症性サイトカイン産生抑制剤を含有することを特徴とする、
マイクログリア細胞におけるインターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-6（IL-6）、又は腫瘍壊死因子（TNF-α）である炎症性サイトカインの産生を抑制するための医薬品又は飲食品。

【請求項3】

経口投与或いは経口的摂取の形態にある請求項2に記載の医薬品又は飲食品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はトマト抽出物を有効成分とする炎症性サイトカイン産生抑制剤、及び炎症性サイトカイン産生抑制飲食品に関する。

【背景技術】

【0002】

炎症性サイトカインとは、リンパ球やマクロファージなどから産生され、細菌やウイルス感染、腫瘍、組織損傷に伴う炎症反応に関与する物質である。例えば、インターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-6（IL-6）、腫瘍壊死因子（TNF- α ）などの炎症性サイトカインは、病原菌の侵入に対して免疫機能を賦活化させるなど、本来的には合目的な機能を有しているが、何らかの原因により過剰に産生され続けるとリウマチ性関節炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、2型糖尿病、肥満症（特に、インスリン抵抗性）など様々な疾病を引き起こすことが知られている。

さらには、神経炎症の観点から、うつ病などを引き起こすことが知られている。

10

【0003】

そのために、このような病態において、TNF- α などのこれら炎症性サイトカインの産生を抑制する薬剤の開発が検討されており、例えば、イブプロフェンやインドメタシン等の既存の抗炎症剤のほか、これまでに種々の化学物質等が提案されている（例えば、特許文献1～3）。しかしながら、これらの疾病は慢性的な経過をたどることが多く、治療は長期化することから、副作用がなく安全な化合物が特に求められている現状下では、いまだ有効なものは登場してきていない。

かかる観点から、有機化合物に限らず、安全性の確保を主体として、果実の果汁及び／又は抽出物、或いは鉄結合性の糖タンパク質であるラクトフェリンを有効成分とする炎症性サイトカイン産生抑制剤の提案（特許文献4、5）などもなされている。

20

【0004】

本発明者らは、より有効であり、且つ、経口投与した場合でも安全である炎症性サイトカイン産生抑制剤の検索を目的として、日常的に安全に摂食されている野菜の抽出物についてその作用を検討してきたなかで、トマトの抽出成分に優れた炎症性サイトカインの産生抑制作用があることを見出し、かかるトマト抽出物が、炎症性サイトカインのなかでも特にIL-6、TNF- α の産生を有意に抑制することを確認し、本願発明を完成させるに至った。

【0005】

ところで、トマト抽出物についてはこれまでに抗アレルギー剤として提案がなされている（特許文献6）。

30

当該特許文献が提案する抗アレルギー剤は、実際的なアレルギー疾患の発症メカニズムに基づく、肥満細胞からのヒスタミンやロイコトリエンなどのケミカルメディエーター遊離抑制作用による抗アレルギー剤としての提案であり、本発明の炎症性サイトカインの産生抑制を目的とするものではない。

【0006】

その点からみれば、トマト抽出物には、種々の薬理活性が期待できるものであり、本発明者らが検討してきた炎症性サイトカインの産生抑制作用の確認も、トマト抽出物の有効活用の一つとして、極めて特異的なものであるといえる。

【先行技術文献】

【特許文献】

40

【0007】

【文献】特開2015-174850号公報

【文献】特開2014-101329号公報

【文献】特開2009-013106号公報

【文献】特開2005-089304号公報

【文献】特開2006-069995号公報

【文献】特開2002-080387号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

50

したがって、本発明は、炎症性サイトカインであるTNF- α やIL-6の産生を抑制し、これら炎症性サイトカインの過剰産生に起因するリウマチ性関節炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、2型糖尿病などの炎症性疾患に有効な医薬品、及び健康食品等の飲食物としての応用が可能な、炎症性サイトカイン産生抑制剤を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

かかる課題を解決するための本発明は、基本的態様として、

(1) トマト抽出物を有効成分とする炎症性サイトカイン産生抑制剤；

(2) 炎症性サイトカインとしてインターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-6 (IL-6)、又は腫瘍壊死因子 (TNF- α) である上記 (1) に記載の炎症性サイトカイン産生抑制剤；

10

(3) トマト抽出物が、生トマトの搾汁液の分子量分画による分子量1万以上の画分である上記 (1) 又は (2) に記載の炎症性サイトカイン産生抑制剤；

(4) 上記 (1) ないし (3) に記載の炎症性サイトカイン産生抑制剤を含有する、医薬品又は飲食品；

(5) 経口投与或いは経口的摂取の形態にある上記 (4) に記載の医薬品又は飲食品；である。

【発明の効果】

【0010】

本発明により、経口的な投与、或いは摂取により安全性の高い炎症性サイトカインの産生抑制剤が提供される。

20

本発明が提供する炎症性サイトカインの産生抑制剤は、例えば、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-6 (IL-6)、並びに腫瘍壊死因子 (TNF- α) などの炎症性サイトカインの過剰の産生を抑制することから、これらサイトカインの過剰産生に起因するリウマチ性関節炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、更には、2型糖尿病、うつ病、肥満症など様々な疾病に対する有効な治療薬となり得るものであり、また、日常的に経口摂取することにより、日々の健康管理を有効に行える利点を有するものである。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】 図1は、試験例1の結果を示す図であり、3時間後の結果を示した。

30

【図2】 図2は、試験例1の結果を示す図であり、6時間後の結果を示した。

【図3】 図3は、試験例2の結果を示す図であり、3時間後の結果を示した。

【図4】 図4は、試験例2の結果を示す図であり、6時間後の結果を示した。

【図5】 図5は、試験例3の結果を示す図であり、3時間後の結果を示した。

【図6】 図6は、試験例3の結果を示す図であり、6時間後の結果を示した。

【図7】 図7は、比較例としての試験例4の結果を示す図であり、3時間後の結果を示した。

【図8】 図8は、試験例5の結果を示す図であり、3時間後の結果を示した。

【図9】 図9は、試験例5の結果を示す図であり、6時間後の結果を示した。

【図10】 図10は、試験例6の結果を示す図であり、3時間後の結果を示した。

40

【図11】 図11は、試験例6の結果を示す図であり、6時間後の結果を示した。

【図12】 図12は、試験例7の結果を示す図であり、3時間後の結果を示した。

【図13】 図13は、試験例7の結果を示す図であり、6時間後の結果を示した。

【発明を実施するための形態】

【0012】

上記したように、本発明の基本的態様は、トマト抽出物を有効成分とする炎症性サイトカイン産生抑制剤である。

本発明が提供する炎症性サイトカイン産生抑制剤における有効成分であるトマト抽出物は、成熟した生トマトをホモジネートし、固形分を除去したいわゆる搾汁液から得られ抽出物である。

50

原料トマトの品種は特に限定されるものではなく、一般に市場に流通している生食用、加工用の品種のいずれであっても使用することが可能である。

【0013】

搾汁の調製に当たっては、乾燥トマトの場合には、通常は、適切な緩衝液、例えば精製水、生理食塩水などと共にホモジネートするが、本発明にあっては水分を多く含む成熟した生トマトを使用することから、緩衝液を用いることなく、生トマトそれ自体をそのまますり潰し、例えば遠心分離による通常の方法により固形分を除去し、搾汁液を得る。

【0014】

次いで、かかる搾汁液からトマト抽出物を得るのであるが、本発明にあっては、その抽出方法として、遠心式限外濾過フィルターを用いて、分子量1万以上の分画として抽出物を得るのがよい。

10

生トマトの搾汁には糖質が多く含まれていることから、分子量を基準として、1万以上の抽出物とするのがよい。

用いる遠心式限外濾過フィルターとしては、目的とする分子量分画に適応し得る種々のフィルターを挙げることができるが、例えば、Merck Millipore社のアミコンウルトラ（登録商標）シリーズを使用することができる。

【0015】

かくして、生トマト抽出物として、分子量1万以上の抽出物を得ることができるが、得られた抽出物はそのまま使用することができる以外、溶媒を留去して濃縮液として、或いは乾燥物として使用することができる。

20

乾燥にあたっては、減圧乾燥、凍結乾燥、噴霧乾燥等の通常の乾燥手段を採用することができるが、なかでも凍結乾燥により乾燥物とするのが好ましい。

【0016】

本発明が提供する生トマト抽出物は、IL-1、IL-6、TNF- α 等の炎症性サイトカインの産生抑制に対して優れた作用を示し、炎症性サイトカインの産生抑制剤として有益なものである。

本発明の炎症性サイトカインの産生抑制剤の投与は、投与目的、疾患の種類、症状によって異なり、特に限定されるものではないが、剤型は、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、粉剤、液剤等にして直接投与したり、食品や飲水に混ぜて投与したりすることができ、経口的に投与することが望ましい。

30

また、これらの剤型は、従来から知られている通常の方法で製造することができ、本発明の効果を損なわない範囲で、必要に応じてデキストリン、乳糖、コーンスターチ、乳化剤、防腐剤、賦形剤、増量剤、甘味剤、香味剤、着色剤等の添加剤を配合することも可能である。

【0017】

一方、本発明の炎症性サイトカイン産生抑制剤は、飲食品として使用することもでき、そのような飲食品としては、清涼飲料水、ジュース等の非アルコール飲料、アルコール飲料、ヨーグルト等の発酵飲料、錠菓（タブレット菓子）や飴等の固形菓子、ガムやグミ菓子糖のチュアブル菓子、並びに、ビタミン、ミネラル、アミノ酸、蛋白等を含有する栄養補助食品等の形態を挙げることができる。

40

かかる飲食品には、機能的に特定保健用食品（いわゆる、「トクホ」）、栄養機能食品、及び機能性表示食品等が含まれる。

【0018】

これらの剤及び飲食品は、炎症性サイトカインの産生抑制能を有するのであり、炎症性サイトカインの過剰産生により引き起こされるさまざまな病態の予防、治療、改善、再発防止に非常に有益なものとなり得るものである。

【0019】

本発明の炎症性サイトカイン産生抑制剤については、その炎症性サイトカイン産生抑制能を発揮させるための投与量としては、投与目的、疾患の種類、症状によって異なり、特に限定されないが、生トマト抽出物として、一日当たり1～5,000mg、好ましくは

50

5～1,000mg、さらに好ましくは、10～200mg摂取できるよう配合量等を調整すれば良い。

なお、本発明の生トマト抽出物は、日常的に摂食されている成熟トマトの搾汁から得られるものであり、安全性が高いものであり、本発明において使用される量では毒性は問題にならない。

【実施例】

【0020】

以下に、実施例及び試験例を示し、本発明についてより詳細に説明するが、これらは単に例示するのみであり、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

【0021】

実施例1：生トマト抽出物の調製

成熟生トマト（鹿児島県において生産）103.96gを裁断し、乳鉢ですり潰した。そのものを、4,000×g／15分間の遠心分離を行い、液体部分として27.5mLを回収した。

液体部分20mLをAmicon Ultra-15（MWCO:10,000）の遠心式限外濾過フィルターを用いた遠心式限外濾過に供し、4,000×gで遠心した。

遠心後、分子量1万以上の高分子画分および分子量1万以下の低分子画分を得、それぞれ凍結乾燥を行い、生トマト抽出物を得た。

【0022】

このようにして得られた生トマト抽出物は、糖質をメインとし、若干のタンパク質を含有するものであり、そのまま本発明の炎症性サイトカイン産生抑制剤として利用可能である。

本発明の生トマト抽出物は上記の方法により得られた分子量1万以上の分子量画分であるが、比較のため、得られた分子量1万以下の分子量画分も、以下の試験に供した。

なお、以下の試験では、得られた生トマト抽出物をDMEN培地（ダルベッコ改変イーグル培地＋10%ウシ血清＋0.1%抗生物質・抗菌薬）で100μg/mLの濃度に調整し、細胞に供した。

【0023】

試験例1：マウスマイクログリア細胞（MG6）での生トマト抽出物のLPS共存下におけるTNF-α mRNA発現に及ぼす作用

以下に、具体的手法を記載する。

（1）マウスマイクログリア細胞株（MG6）を6-well plateに、 1×10^5 細胞/mLを撒く。

（2）3日から4日後に、コントロール（DMEN培地、1mL/well）、LPS（5ng/mL）、LPS（5ng）＋生トマト高分子抽出物（100μg）〔液量は1mL〕及び生トマト高分子抽出物（100μg/mL）の4群の溶液を細胞に適用する。

（3）3時間後および6時間後に培地を抜き取り、0.3mLのRLT溶液（RNeasy Mini kit, QIAGEN）（1%β-メルカプトエタノールを含む）をwellに加える。

（4）セルスクレーパーで細胞をこすり取る。

（5）細胞懸濁液に70%エタノールを0.3mL加え、混和する。

（6）スピncラム（RNeasy Mini kit, QIAGEN）に上記溶液を入れて、8,000×gで1分間遠心する。

（7）スピncラムに700μLのRW1溶液（RNeasy Mini kit, QIAGEN）を入れて、8,000×gで1分間遠心する。

（8）スピncラムに500μLのRPE溶液（RNeasy Mini kit, QIAGEN）を入れて、8,000×gで1分間遠心する。このステップを2回繰り返す。

【0024】

（9）スピncラムを新しいチューブ（1.5mL）にセットし、50μLのRNase-free水を入れて、1分間静置し、12,000×gで1分間遠心する。このステップを2回繰り返す。

10

20

30

40

50

(10) この水溶液の11 μ Lを用いて、Versco cDNA Synthesis Kit (thermoscientific) により、cDNAを作製する。

(11) 上記で得られたcDNA溶液をRNase-free水で10倍希釈する。

(12) この希釈したcDNA溶液を用いて、GAPDH mRNAとTNF- α mRNAの発現を、スタンダード法によるリアルタイムRT-PCR法で測定した。

【0025】

(13) PCRには96-wellプレートを用いた。

(14) Wellには、水：8.5 μ L、cDNAサンプル溶液：2.5 μ L、GAPDH mRNA検出プライマーあるいはTNF- α mRNA検出プライマー (forward+reverse)：1.5 μ L、Sybergreen mater mix：12.5 μ Lを加える。

(15) PCRのサーマルサイクルの条件は、Hold、94°C、10分+3 step PCR (40サイクル；94°C、30分+55°C、30秒+72°C、30秒)+Hold、72°C、1分とした。

(16) 各群のサンプルごとに、TNF- α mRNA/GAPDH mRNAの値を求め、コントロールの平均値を100%として、それぞれの値を%に換算した。

(17) 統計学的有意差検定は、分散分析後、Turkey-Kramer法を用いた。

【0026】

その結果を、図1及び2に示した。

図1は3時間後の結果であり、図2は6時間後の結果である。

図1に示した結果からも判明するように、本発明の生トマト抽出物は、3時間後の結果において、TNF- α mRNAの発現を効果的に抑制していることが理解される。

【0027】

試験例2：マウスマイクログリア細胞(MG6)での生トマト抽出物のLPS共存下におけるIL-1 β mRNA発現に及ぼす作用

以下に、具体的手法を記載するが、その手法は、上記試験例1に準ずるものである。

(1) マウスマイクログリア細胞株(MG6)を6-well plateに、 1×10^5 細胞/mLを撒く。

(2) 3日から4日後に、コントロール(DMEN培地、1mL/well)、LPS(5 ng/mL)、LPS(5 ng)+生トマト高分子抽出物(100 μ g) [液量は1mL]及び生トマト高分子抽出物(100 μ g/mL)の4群の溶液を細胞に適用する。

(3) 3時間後および6時間後に培地を抜き取り、0.3mLのRLT溶液(RNeasy Mini kit, QIAGEN) (1% β -メルカプトエタノールを含む)をwellに加える。

(4) セルスクレーパーで細胞をこすり取る。

(5) 細胞懸濁液に70%エタノールを0.3mL加え、混和する。

(6) スピнкаラム(RNeasy Mini kit, QIAGEN)に上記溶液を入れて、8,000 $\times$ gで1分間遠心する。

(7) スピнкаラムに700 μ LのRW1溶液(RNeasy Mini kit, QIAGEN)を入れて、8,000 $\times$ gで1分間遠心する。

(8) スピнкаラムに500 μ LのRPE溶液(RNeasy Mini kit, QIAGEN)を入れて、8,000 $\times$ gで1分間遠心する。このステップを2回繰り返す。

【0028】

(9) スピнкаラムを新しいチューブ(1.5mL)にセットし、50 μ LのRNase-free水を入れて、1分間静置し、12,000 $\times$ gで1分間遠心する。このステップを2回繰り返す。

(10) この水溶液の11 μ Lを用いて、Versco cDNA Synthesis Kit (thermoscientific) により、cDNAを作製する。

(11) 上記で得られたcDNA溶液をRNase-free水で10倍希釈する。

(12) この希釈したcDNA溶液を用いて、GAPDH mRNAとIL-1 β mRNAの発現を、スタンダード法によるリアルタイムRT-PCR法で測定した。

【0029】

10

20

30

40

50

(13) PCRには96-wellプレートを用いた。

(14) Wellには、水：8.5 μ L、cDNAサンプル溶液：2.5 μ L、GAPDH mRNA検出プライマーあるいはIL-1 β mRNA検出プライマー (forward+reverse)：1.5 μ L、Sybergreen mater mix：12.5 μ Lを加える。

(15) PCRのサーマルサイクルの条件は、Hold、94℃、10分+3 step PCR (40サイクル；94℃、30分+55℃、30秒+72℃、30秒)+Hold、72℃、1分とした。

(16) 各群のサンプルごとに、IL-1 β mRNA/GAPDH mRNAの値を求め、コントロールの平均値を100%として、それぞれの値を%に換算した。

(17) 統計学的有意差検定は、分散分析後、Turkey-Kramer法を用いた。

10

【0030】

その結果を、図3及び4に示した。

図3は3時間後の結果であり、図4は6時間後の結果である。

図に示した結果からも判明するように、本発明の生トマト抽出物は、3時間後の結果において、IL-1 β mRNAの発現を効果的に抑制していることが理解される。

【0031】

試験例3：マウスマイクログリア細胞 (MG6) での生トマト抽出物のLPS共存下におけるIL-6 mRNA発現に及ぼす作用

以下に、具体的手法を記載するが、その手法は、上記試験例1に準ずるものである。

(1) マウスマイクログリア細胞株 (MG6) を6-well plateに、 1×10^5 細胞/mLを撒く。

20

(2) 3日から4日後に、コントロール (DMEN培地、1mL/well)、LPS (5 ng/mL)、LPS (5 ng) + 生トマト高分子抽出物 (100 μ g) [液量は1mL] 及び生トマト高分子抽出物 (100 μ g/mL) の4群の溶液を細胞に適用する。

(3) 3時間後および6時間後に培地を抜き取り、0.3mLのRLT溶液 (RNeasy Mini kit, QIAGEN) (1% β -メルカプトエタノールを含む) をwellに加える。

(4) セルスクレーパーで細胞をこすり取る。

(5) 細胞懸濁液に70%エタノールを0.3mL加え、混和する。

(6) スピнкаラム (RNeasy Mini kit, QIAGEN) に上記溶液を入れて、8,000 $\times$ gで1分間遠心する。

30

(7) スピнкаラムに700 μ LのRW1溶液 (RNeasy Mini kit, QIAGEN) を入れて、8,000 $\times$ gで1分間遠心する。

(8) スピнкаラムに500 μ LのRPE溶液 (RNeasy Mini kit, QIAGEN) を入れて、8,000 $\times$ gで1分間遠心する。このステップを2回繰り返す。

【0032】

(9) スピнкаラムを新しいチューブ (1.5mL) にセットし、50 μ LのRNase-free水を入れて、1分間静置し、12,000 $\times$ gで1分間遠心する。このステップを2回繰り返す。

(10) この水溶液の11 μ Lを用いて、Versco cDNA Synthesis Kit (thermoscientific) により、cDNAを作製する。

40

(11) 上記で得られたcDNA溶液をRNase-free水で10倍希釈する。

(12) この希釈したcDNA溶液を用いて、GAPDH mRNAとIL-6 mRNAの発現を、スタンダード法によるリアルタイムRT-PCR法で測定した。

【0033】

(13) PCRには96-wellプレートを用いた。

(14) Wellには、水：8.5 μ L、cDNAサンプル溶液：2.5 μ L、GAPDH mRNA検出プライマーあるいはIL-6 mRNA検出プライマー (forward+reverse)：1.5 μ L、Sybergreen mater mix：12.5 μ Lを加える。

(15) PCRのサーマルサイクルの条件は、Hold、94℃、10分+3 step PCR (40サイクル；94℃、30分+55℃、30秒+72℃、30秒)+Hold、72℃、1

50

分とした。

(16) 各群のサンプルごとに、IL-6 mRNA/GAPDH mRNAの値を求め、コントロールの平均値を100%として、それぞれの値を%に換算した。

(17) 統計学的有意差検定は、分散分析後、Turkey-Kramer法を用いた。

【0034】

その結果を、図5及び6に示した。

図5は3時間後の結果であり、図6は6時間後の結果である。

図に示した結果からも判明するように、本発明の生トマト抽出物は、3時間後及び6時間後の結果において、IL-6 mRNAの発現を効果的に抑制していることが理解される。

【0035】

試験例4：マウスマイクログリア細胞(MG6)での生トマト抽出物のLPS共存下におけるTNF-α mRNA発現に及ぼす作用

比較のため、生トマト抽出物として低分子量(分子量1万以下)画分の炎症性サイトカインの産生抑制作用を検討した。

低分子量の生トマト抽出物として100 µg/mL用いて試験例1と同様の手法より検討した。

その結果を図7に示した。

図7に示した結果からも判明するように、低分子の生トマト抽出物には炎症性サイトカインの産生抑制効果は認められず、分子量として1万以上の高分子量画分の生トマト抽出物に炎症性サイトカインの産生抑制効果が認められることが判明した。

【0036】

試験例5：マウスマクロファージ(Raw264)での生トマト抽出物のLPS共存下におけるTNF-α mRNA発現に及ぼす作用

試験例1におけるマウスマイクログリア細胞株(MG6)に代えて、マウスマクロファージ細胞株(Raw264)を用いて、同様の手法により検討した。

すなわち、以下の具体的手法により検討した。

(1) マウスマクロファージ細胞株(Raw264)を6-well plateに、 1×10^5 細胞/mLを撒く。

(2) 3日から4日後に、コントロール(DMEM培地、1 mL/well)、LPS (5 ng/mL)、LPS (5 ng) + 生トマト高分子抽出物 (100 µg) [液量は1 mL] 及び生トマト高分子抽出物 (100 µg/mL) の4群の溶液を細胞に適用する。

(3) 3時間後および6時間後に培地を抜き取り、0.3 mLのRLT溶液(RNeasy Mini kit, QIAGEN) (1% β-メルカプトエタノールを含む) をwellに加える。

(4) セルスクレーパーで細胞をこすり取る。

(5) 細胞懸濁液に70%エタノールを0.3 mL加え、混和する。

(6) スピнкаラム(RNeasy Mini kit, QIAGEN)に上記溶液を入れて、 $8,000 \times g$ で1分間遠心する。

(7) スピнкаラムに700 µLのRW1溶液(RNeasy Mini kit, QIAGEN)を入れて、 $8,000 \times g$ で1分間遠心する。

(8) スピнкаラムに500 µLのRPE溶液(RNeasy Mini kit, QIAGEN)を入れて、 $8,000 \times g$ で1分間遠心する。このステップを2回繰り返す。

【0037】

(9) スピнкаラムを新しいチューブ(1.5 mL)にセットし、50 µLのRNase-free水を入れて、1分間静置し、 $12,000 \times g$ で1分間遠心する。このステップを2回繰り返す。

(10) この水溶液の11 µLを用いて、Versco cDNA Synthesis Kit (thermoscientific) により、cDNAを作製する。

(11) 上記で得られたcDNA溶液をRNase-free水で10倍希釈する。

(12) この希釈したcDNA溶液を用いて、GAPDH mRNAとTNF-α mRNA

10

20

30

40

50

Aの発現を、スタンダード法によるリアルタイムRT-PCR法で測定した。

【0038】

(13) PCRには96-wellプレートを用いた。

(14) Wellには、水：8.5 μ L、cDNAサンプル溶液：2.5 μ L、GAPDH mRNA検出プライマーあるいはTNF- α mRNA検出プライマー (forward+reverse)：1.5 μ L、Sybergreen mater mix：12.5 μ Lを加える。

(15) PCRのサーマルサイクルの条件は、Hold、94 $^{\circ}$ C、10分+3 step PCR (40サイクル；94 $^{\circ}$ C、30分+55 $^{\circ}$ C、30秒+72 $^{\circ}$ C、30秒)+Hold、72 $^{\circ}$ C、1分とした。

(16) 各群のサンプルごとに、TNF- α mRNA/GAPDH mRNAの値を求め、コントロールの平均値を100%として、それぞれの値を%に換算した。

(17) 統計学的有意差検定は、分散分析後、Turkey-Kramer法を用いた。

【0039】

その結果を、図8及び9に示した。

図8は3時間後の結果であり、図9は6時間後の結果である。

図9に示した結果からも判明するように、本発明の生トマト抽出物は、6時間後の結果において、TNF- α mRNAの発現を効果的に抑制していることが理解される。

【0040】

試験例6：マウスマクロファージ (Raw264) での生トマト抽出物のLPS共存下におけるIL-1 β mRNA発現に及ぼす作用

試験例5の手法に順じ、検討した。

すなわち、

(1) マウスマクロファージ細胞株 (Raw264) を6-well plateに、 1×10^5 細胞/mLを撒く。

(2) 3日から4日後に、コントロール (DMEN培地、1mL/well)、LPS (5ng/mL)、LPS (5ng) + 生トマト高分子抽出物 (100 μ g) [液量は1mL] 及び生トマト高分子抽出物 (100 μ g/mL) の4群の溶液を細胞に適用する。

(3) 3時間後および6時間後に培地を抜き取り、0.3mLのRLT溶液 (RNeasy Mini kit, QIAGEN) (1% β -メルカプトエタノールを含む) をwellに加える。

(4) セルスクレーパーで細胞をこすり取る。

(5) 細胞懸濁液に70%エタノールを0.3mL加え、混和する。

(6) スピнкаラム (RNeasy Mini kit, QIAGEN) に上記溶液を入れて、8,000 $\times$ gで1分間遠心する。

(7) スピнкаラムに700 μ LのRW1溶液 (RNeasy Mini kit, QIAGEN) を入れて、8,000 $\times$ gで1分間遠心する。

(8) スピнкаラムに500 μ LのRPE溶液 (RNeasy Mini kit, QIAGEN) を入れて、8,000 $\times$ gで1分間遠心する。このステップを2回繰り返す。

【0041】

(9) スピнкаラムを新しいチューブ (1.5mL) にセットし、50 μ LのRNase-free水を入れて、1分間静置し、12,000 $\times$ gで1分間遠心する。このステップを2回繰り返す。

(10) この水溶液の11 μ Lを用いて、Versco cDNA Synthesis Kit (thermoscientific) により、cDNAを作製する。

(11) 上記で得られたcDNA溶液をRNase-free水で10倍希釈する。

(12) この希釈したcDNA溶液を用いて、GAPDH mRNAとIL-1 β mRNAの発現を、スタンダード法によるリアルタイムRT-PCR法で測定した。

【0042】

(13) PCRには96-wellプレートを用いた。

(14) Wellには、水：8.5 μ L、cDNAサンプル溶液：2.5 μ L、GAPDH mRNA検出プライマーあるいはIL-1 β mRNA検出プライマー (forward+rever

10

20

30

40

50

se) : 1.5 μ L、Sybergreen mater mix : 12.5 μ Lを加える。

(15) PCRのサーマルサイクルの条件は、Hold、94℃、10分+3 step PCR (40サイクル; 94℃、30分+55℃、30秒+72℃、30秒)+Hold、72℃、1分とした。

(16) 各群のサンプルごとに、IL-1 β mRNA / GAPDH mRNAの値を求め、コントロールの平均値を100%として、それぞれの値を%に換算した。

(17) 統計学的有意差検定は、分散分析後、Turkey-Kramer法を用いた。

【0043】

その結果を、図10及び11に示した。

図10は3時間後の結果であり、図11は6時間後の結果である。

【0044】

試験例7：マウスマクロファージ (Raw264) での生トマト抽出物のLPS共存下におけるIL-6 mRNA発現に及ぼす作用

試験例5及び6に順じ、マウスマクロファージ細胞株 (Raw264) を用いて、IL-6 mRNAの発現に及ぼす作用を検討した。

【0045】

その結果を、図12及び13に示した。

図12は3時間後の結果であり、図13は6時間後の結果である。

【0046】

以上の試験例5ないし7の検討の結果から、本発明の生トマト抽出物は、特にマウスマクロファージ細胞株 (Raw264) で、LPS刺激によるTNF- α mRNA発現の上昇を有意に抑制していることが理解される。

【0047】

上記した各試験例の結果からもよく理解できるように、本発明の生トマト抽出物は、その分子量が1万以上の高分子量画分のもは、低分子量画分に比較して、良好に炎症性サイトカイン産生抑制効果が発揮されており、従って、本発明の高分子トマト抽出物に抗炎症作用があることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0048】

本発明により、経口的な投与、或いは摂取により安全性の高い炎症性サイトカインの産生抑制剤が提供される。

本発明が提供する炎症性サイトカインの産生抑制剤は、例えば、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-6 (IL-6)、並びに腫瘍壊死因子 (TNF- α) などの炎症性サイトカインの過剰の産生を抑制することから、これらサイトカインの過剰産生に起因するリウマチ性関節炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、2型糖尿病、肥満症 (特に、インスリン抵抗性)、更にはうつ病など様々な疾病に対する有効な治療薬となり得るものであり、また、日常的に経口摂取することにより、日々の健康管理を有効に行える利点を有するものであり、その産業上の利用性は多大なものである。

10

20

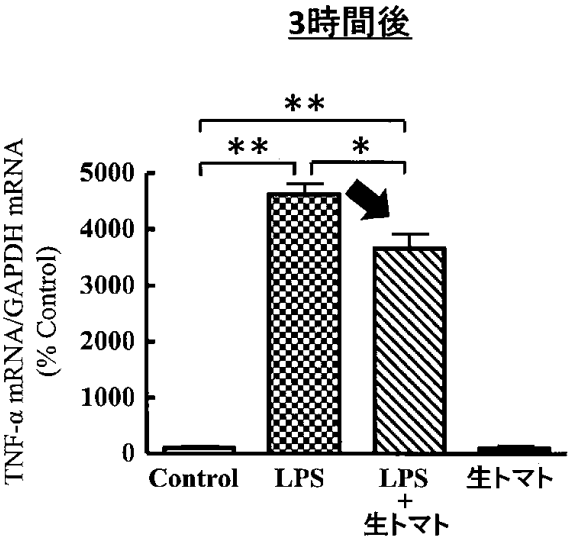
30

40

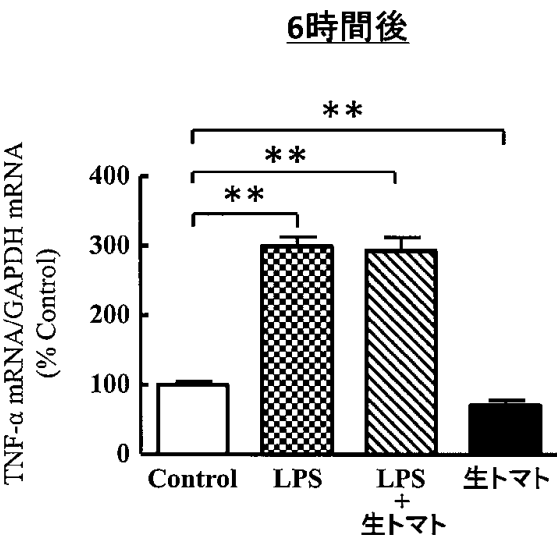
50

【図面】

【図 1】

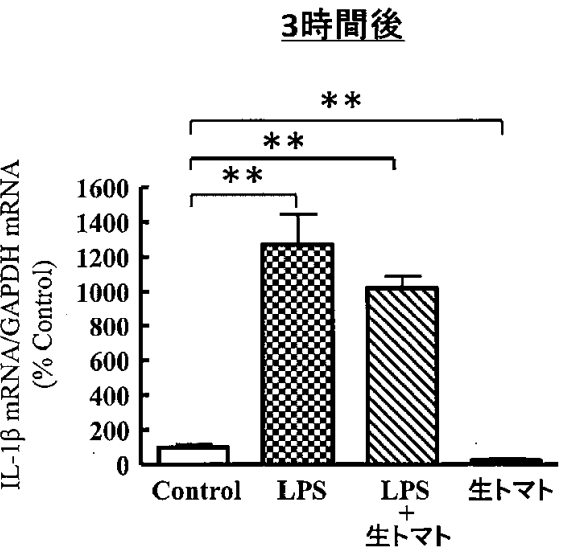


【図 2】

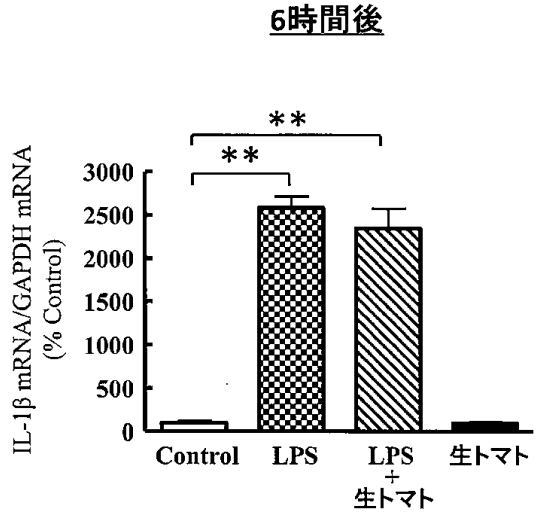


10

【図 3】



【図 4】



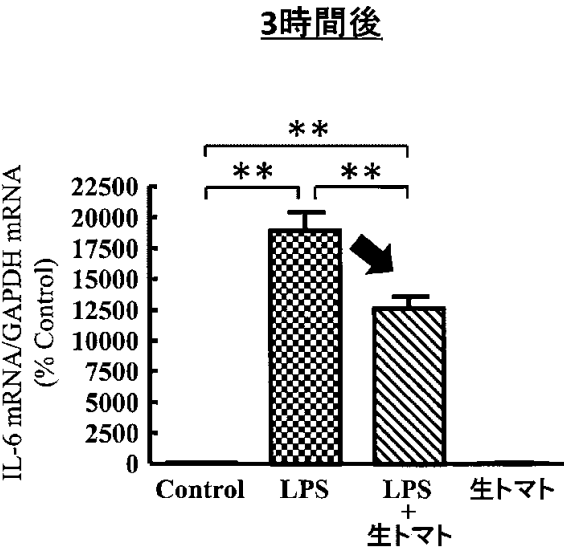
20

30

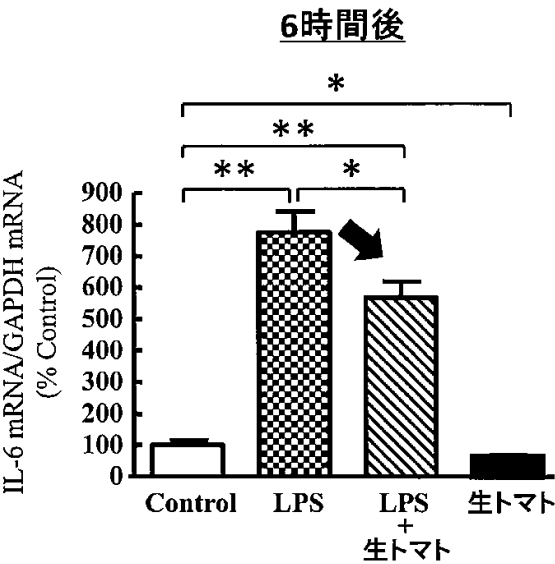
40

50

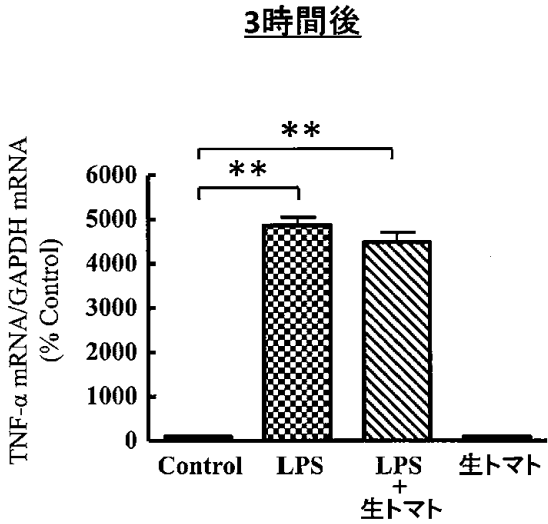
【図 5】



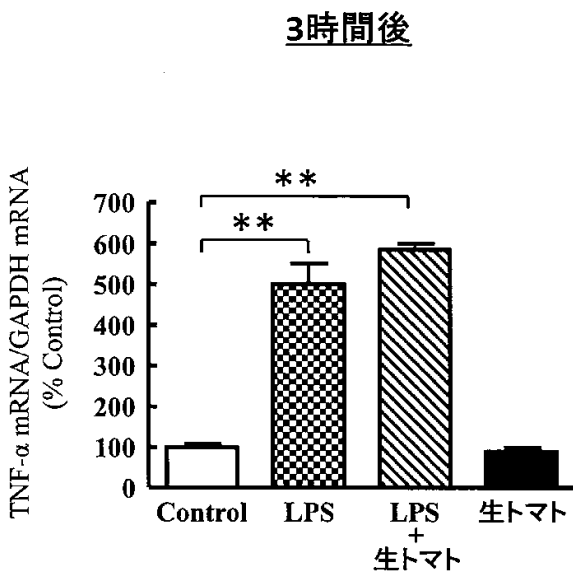
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

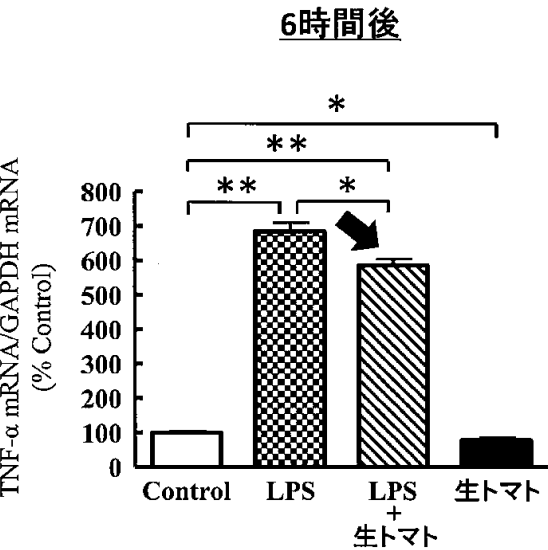
20

30

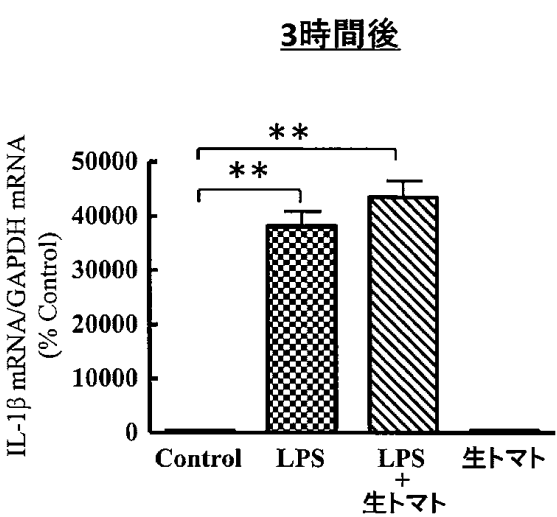
40

50

【図 9】

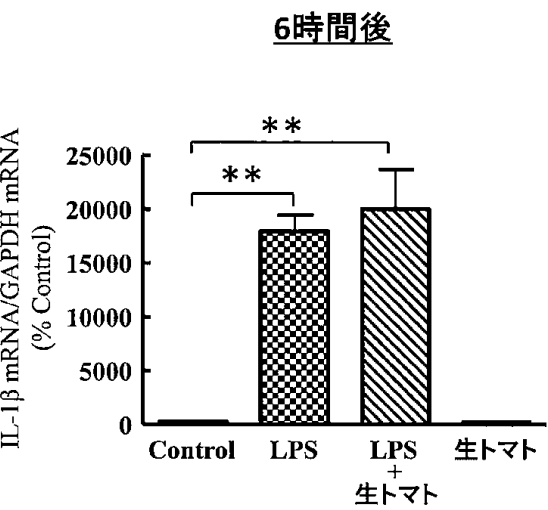


【図 10】

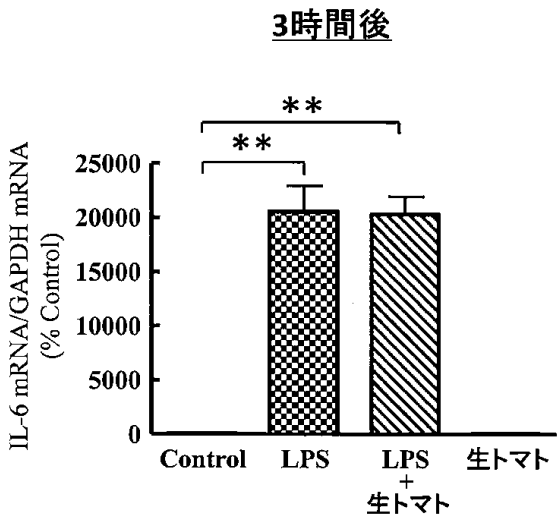


10

【図 11】



【図 12】



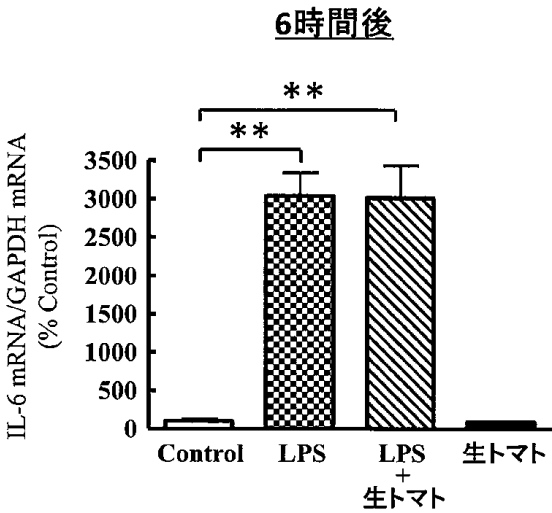
20

30

40

50

【図 1 3】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	25/24	(2006.01)	A 6 1 P	25/24	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 2 3 L	33/105	(2016.01)	A 2 3 L	33/105	
A 6 1 K	131/00	(2006.01)	A 6 1 K	131:00	

(56)参考文献

特表 2 0 1 6 - 5 0 8 9 7 6 (J P , A)
国際公開第 2 0 0 7 / 0 6 8 7 7 3 (W O , A 1)
特表 2 0 1 6 - 5 0 5 0 3 7 (J P , A)
特表 2 0 0 9 - 5 3 8 8 9 5 (J P , A)
特開 2 0 1 6 - 1 9 6 4 6 1 (J P , A)
特表 2 0 1 8 - 5 0 1 3 0 5 (J P , A)
特開 2 0 1 2 - 0 0 6 8 8 9 (J P , A)
NAVARRETE,S. et al., Aqueous Extract of Tomato(Solanum lycopersicum L.) and Ferulic Acid Reduce the Expression of TNF- α , Molecules, 2015年, Vol.20,No.8, pp.15319-15329
GIUSEPPINA,T. et al., Chemical, pharmacological and biotechnological application by industrial tomato waste and analysis o, Current Topics in Biotechnology, 2008年, Vol.4, pp.109-117
KIM,Y. et al., Tomato extract suppresses the production of proinflammatory mediators induced by interaction between, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2015年, Vol.79,No.1, pp.82-87
SCHWAGER,J. et al., Tomato Aqueous Extract Modulates the Inflammatory Profile of Immune Cells and Endothelial Cells, Molecules, 2016年, Vol.21,No.168, pp.1-15

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 6 / 0 0 - 3 6 / 9 0 6 8
A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0
A 2 3 L 3 1 / 0 0 - 3 3 / 2 9
A 6 1 K 1 3 1 : 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)