

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6321521号
(P6321521)

(45) 発行日 平成30年5月9日(2018.5.9)

(24) 登録日 平成30年4月13日(2018.4.13)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 K 35/56	(2015.01)	A 6 1 K 35/56	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 2 3 L 33/10	(2016.01)	A 2 3 L 33/10	

請求項の数 16 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2014-223977 (P2014-223977)	(73) 特許権者	506329948 Well Stone 有限会社 宮崎県宮崎市田野町甲6742番地1
(22) 出願日	平成26年11月4日(2014.11.4)	(74) 代理人	100096714 弁理士 本多 一郎
(65) 公開番号	特開2016-88877 (P2016-88877A)	(74) 代理人	100124121 弁理士 杉本 由美子
(43) 公開日	平成28年5月23日(2016.5.23)	(74) 代理人	100176566 弁理士 渡未 巧
審査請求日	平成29年10月5日(2017.10.5)	(74) 代理人	100180253 弁理士 大田黒 隆
早期審査対象出願		(72) 発明者	石井陽一 宮崎県宮崎市鶴島3丁目122-1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タウ蛋白産生促進剤、タウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療薬・予防薬および治療用・予防用食品組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アカミミズ(Lumbricus rubellus)の水若しくはエタノール水溶液の抽出物及び/又は前記抽出物の乾燥粉末を有効成分として含有することを特徴とするタウ蛋白産生促進剤。

【請求項2】

アカミミズ(Lumbricus rubellus)の水若しくはエタノール水溶液の抽出物及び/又は前記抽出物の乾燥粉末を有効成分として含有することを特徴とする、タウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療薬または予防薬。

【請求項3】

アカミミズ(Lumbricus rubellus)の水若しくはエタノール水溶液の抽出物及び/又は前記抽出物の乾燥粉末を有効成分として含有することを特徴とする、タウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療用または予防用食品組成物。

【請求項4】

前記タウ蛋白の欠乏に起因する疾患が、アルツハイマー病である請求項2記載の治療薬または予防薬。

【請求項5】

前記タウ蛋白の欠乏に起因する疾患が、アルツハイマー病である請求項3記載の治療用または予防用食品組成物。

【請求項6】

アカミミズ (*Lumbricus rubellus*) の摩砕物の乾燥粉末、水若しくはエタノール水溶液の抽出物、及び/又は、前記抽出物の乾燥粉末を使用することを特徴とするタウ蛋白産生促進剤の製造方法。

【請求項 7】

アカミミズ (*Lumbricus rubellus*) の水若しくはエタノール水溶液の抽出物、及び/又は、前記抽出物の乾燥粉末を使用することを特徴とするタウ蛋白産生促進剤の製造方法であって、

生のアカミミズ (*Lumbricus rubellus*) をカリウム、ナトリウム、マグネシウムおよびカルシウムからなる群から選ばれる少なくとも 1 種の金属の塩化物と接触させ、

その後、粉末状ヒドロキシカルボン酸と生のアカミミズとを接触させ、水で希釈して pH 2 ~ 5 に調整し、3 ~ 180 分間保持した後、生のアカミミズを水洗し、摩砕し、得られた摩砕物を凍結乾燥したものを水またはエタノール水溶液に溶解し、不溶性画分を除去または分離する工程を備えることを特徴とするタウ蛋白産生促進剤の製造方法。

【請求項 8】

アカミミズ (*Lumbricus rubellus*) の水若しくはエタノール水溶液の抽出物、及び/又は、前記抽出物の乾燥粉末を使用することを特徴とするタウ蛋白産生促進剤の製造方法であって、

生のアカミミズ (*Lumbricus rubellus*) をカリウム、ナトリウム、マグネシウムおよびカルシウムからなる群から選ばれる少なくとも 1 種の金属の塩化物と接触させ、

その後、生のアカミミズを pH 2 ~ 5 に調整したヒドロキシカルボン酸水溶液中に浸漬し、3 ~ 180 分間保持したのち、生のアカミミズを水洗し、摩砕し、得られた摩砕物を凍結乾燥したものを水またはエタノール水溶液に溶解し、不溶性画分を除去または分離する工程を備えることを特徴とするタウ蛋白産生促進剤の製造方法。

【請求項 9】

アカミミズ (*Lumbricus rubellus*) の摩砕物の乾燥粉末、水若しくはエタノール水溶液の抽出物、及び/又は、前記抽出物の乾燥粉末を使用することを特徴とするタウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療薬または予防薬の製造方法。

【請求項 10】

アカミミズ (*Lumbricus rubellus*) の水若しくはエタノール水溶液の抽出物、及び/又は、前記抽出物の乾燥粉末を使用するタウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療薬または予防薬の製造方法であって、

生のアカミミズをカリウム、ナトリウム、マグネシウムおよびカルシウムからなる群から選ばれる少なくとも 1 種の金属の塩化物と接触させ、

その後、粉末状ヒドロキシカルボン酸と生のアカミミズとを接触させ、水で希釈して pH 2 ~ 5 に調整し、3 ~ 180 分間保持した後、生のアカミミズを水洗し、摩砕し、得られた摩砕物を凍結乾燥したものを水またはエタノール水溶液に溶解し、不溶性画分を除去または分離する工程を備えることを特徴とするタウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療薬または予防薬の製造方法。

【請求項 11】

アカミミズ (*Lumbricus rubellus*) の水若しくはエタノール水溶液の抽出物、及び/又は、前記抽出物の乾燥粉末を使用するタウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療薬または予防薬の製造方法であって、

生のアカミミズをカリウム、ナトリウム、マグネシウムおよびカルシウムからなる群から選ばれる少なくとも 1 種の金属の塩化物と接触させ、

その後、生のアカミミズを pH 2 ~ 5 に調整したヒドロキシカルボン酸水溶液中に浸漬し、3 ~ 180 分間保持したのち、生のアカミミズを水洗し、摩砕し、得られた摩砕物を凍結乾燥したものを水またはエタノール水溶液に溶解し、不溶性画分を除去または分離する工程を備えることを特徴とするタウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療薬または予防薬の

10

20

30

40

50

製造方法。

【請求項 1 2】

前記タウ蛋白の欠乏に起因する疾患が、アルツハイマー病である請求項 1 0 または 1 1 記載の治療薬または予防薬の製造方法。

【請求項 1 3】

アカミミズ (*Lumbricus rubellus*) の摩砕物の乾燥粉末、水若しくはエタノール水溶液の抽出物、及び/又は、前記抽出物の乾燥粉末を使用することを特徴とするタウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療用または予防用食品組成物の製造方法。

【請求項 1 4】

アカミミズ (*Lumbricus rubellus*) の水若しくはエタノール水溶液の抽出物、及び/又は、前記抽出物の乾燥粉末を使用するタウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療用または予防用食品組成物の製造方法であって、

生のアカミミズをカリウム、ナトリウム、マグネシウムおよびカルシウムからなる群から選ばれる少なくとも 1 種の金属の塩化物と接触させ、

その後、粉末状ヒドロキシカルボン酸と生のアカミミズとを接触させ、水で希釈して pH 2 ~ 5 に調整し、3 ~ 180 分間保持した後、生のアカミミズを水洗し、摩砕し、得られた摩砕物を凍結乾燥したものを水またはエタノール水溶液に溶解し、不溶性画分を除去または分離する工程を備えることを特徴とするタウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療用または予防用食品組成物の製造方法。

【請求項 1 5】

アカミミズ (*Lumbricus rubellus*) の水若しくはエタノール水溶液の抽出物、及び/又は、前記抽出物の乾燥粉末を使用するタウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療用または予防用食品組成物の製造方法であって、

生のアカミミズをカリウム、ナトリウム、マグネシウムおよびカルシウムからなる群から選ばれる少なくとも 1 種の金属の塩化物と接触させ、

その後、生のアカミミズを pH 2 ~ 5 に調整したヒドロキシカルボン酸水溶液中に浸漬し、3 ~ 180 分間保持したのち、生のアカミミズを水洗し、摩砕し、得られた摩砕物を凍結乾燥したものを水またはエタノール水溶液に溶解し、不溶性画分を除去または分離する工程を備えることを特徴とするタウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療用または予防用食品組成物の製造方法。

【請求項 1 6】

前記タウ蛋白の欠乏に起因する疾患が、アルツハイマー病である請求項 1 4 または 1 5 記載のタウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療用または予防用食品組成物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、タウ蛋白産生促進剤、タウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療薬・予防薬、タウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療用・予防用食品組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

タウ蛋白は、微小管結合蛋白質 (*microtubule-associated protein*) の一種である。タウ蛋白は中枢神経系の神経細胞に特に多く含まれており、細胞骨格の一つである微小管を主として構成するチューブリンと呼ばれる蛋白質に結合し、微小管の安定化やチューブリンが微小管へと会合することを促進する働きを有する。また、タウ蛋白が、チューブリン以外にも他のシグナル分子群 (*Src family*、*PI3K*、*Fyn*) と会合することや、神経突起伸長や神経成長円錐伸長を促すことが知られている (例えば非特許文献 1 ~ 3)。

【0003】

生体内において、タウ蛋白の過剰なリン酸化が生じ得る。タウ蛋白が過剰にリン酸化されると、チューブリンとの結合が阻害され、微小管の減少が引き起こされたり、また、微

10

20

30

40

50

小管が不安定化し細胞内の物質輸送が抑制される（例えば、非特許文献4、5）。過剰にリン酸化したタウ蛋白は凝集し、神経原線維変化と呼ばれる凝集体を形成する。神経原線維変化が脳内に発生するアルツハイマー病や進行性核上性麻痺は、タウオパチー（tauopathy）と呼ばれる神経変性疾患に分類されている。

【0004】

タウ蛋白の働きを補うことによって、タウオパチーを治療する方法が提案されている。例えば、米国特許第5,580,898号には、微小管を安定化させることによって、アルツハイマー病の患者を治療するために、パクリタキセル[TAXOL（登録商標）]を使用することが示唆されている。また、特許文献1には、微小管安定剤であるエポチロンDを用いたタウオパチー治療の効果的な療法が記載されている。

10

【0005】

一方、ミミズ抽出物やミミズ乾燥粉末は、古来より主として東洋諸国において、各種疾病の予防剤、治療剤として用いられており、これまでに膀胱内結石縮小剤及び排出促進剤、黄疸治療剤、分娩促進剤、強壯剤、育毛剤、強精剤、解熱剤、ひきつけ治療剤、血行促進剤、半身不随治療剤、間接鎮痛剤、利尿剤、気管支喘息剤、高血圧症治療剤としての用途が知られている。

しかし、これまでアルツハイマー病等のタウオパチーの予防・治療にミミズを利用した報告例はない。

【先行技術文献】

【特許文献】

20

【0006】

【特許文献1】特表2011-522782号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Lee, G, Biochimica et Biophysica Acta (2005) 1739: 323-330

【非特許文献2】Reynolds, CH et al., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (2008) 283: 18177-18186

【非特許文献3】Nemoto, T et al., Neurochemistry International (2011) 59: 880-888

30

【非特許文献4】Bramblett GT, et al., Neuron (1993) 10: 1089-1099

【非特許文献5】Yoshida H, et al., J Neurochem (1993) 61: 1183-86

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

アルツハイマー病等のタウオパチーの治療には長期間の薬剤の投与を伴うと考えられることから、安全で副作用の少ない薬剤が特に必要であり、リン酸化により正常に働かなくなったタウ蛋白の働きを補う天然物由来の予防・治療薬が求められていた。

40

【0009】

そこで本発明の目的は、天然物を有効成分として含有するタウ蛋白産生促進剤、タウ蛋白の欠乏に起因する疾患の予防・治療剤、タウ蛋白の欠乏に起因する疾患の症状の改善用食品組成物および改善用医薬用組成物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

即ち、本発明のタウ蛋白産生促進剤は、ミミズの水若しくはエタノール水溶液の抽出物及び/又は前記抽出物の乾燥粉末を有効成分として含有することを特徴とするものである。

50

【0011】

本発明のタウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療薬または予防薬は、ミミズの水若しくはエタノール水溶液の抽出物及び/又は前記抽出物の乾燥粉末を有効成分として含有することを特徴とするものである。

【0012】

本発明のタウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療用または予防用食品組成物は、ミミズの水若しくはエタノール水溶液の抽出物及び/又は前記抽出物の乾燥粉末を有効成分として含有することを特徴とするものである。

【0013】

本発明のタウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療薬または予防薬は、前記タウ蛋白の欠乏に起因する疾患が、アルツハイマー病であることが好ましい。

10

【0014】

本発明のタウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療用または予防用食品組成物は、前記タウ蛋白の欠乏に起因する疾患が、アルツハイマー病であることが好ましい。

【0015】

本発明のタウ蛋白産生促進剤の製造方法は、ミミズの乾燥粉末、水若しくはエタノール水溶液の抽出物、及び/又は、前記抽出物の乾燥粉末を使用することを特徴とするものである。

【0016】

本発明のタウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療薬または予防薬の製造方法は、ミミズの乾燥粉末、水若しくはエタノール水溶液の抽出物、及び/又は、前記抽出物の乾燥粉末を使用することを特徴とするものである。

20

【0017】

本発明のタウ蛋白の欠乏に起因する疾患の治療用または予防用食品組成物の製造方法は、ミミズの乾燥粉末、水若しくはエタノール水溶液の抽出物、及び/又は、前記抽出物の乾燥粉末を使用することを特徴とするものである。

【発明の効果】

【0018】

本発明により、天然物を有効成分として含有するタウ蛋白産生促進剤、タウ蛋白の欠乏に起因する疾患の予防・治療剤、タウ蛋白の欠乏に起因する疾患の症状の改善用食品組成物および改善用医薬用組成物を提供することができる。

30

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】ミミズ乾燥粉末溶解培養液中の培養（48時間、37℃、ミミズ乾燥粉末溶解濃度100ng/ml）による、ラット海馬ニューロンのタウ蛋白（Tau）、Akt、GSK-3 β 及び α -アクチンの産生量の変化、並びに、タウ蛋白（Tau）、Akt及びGSK-3 β のリン酸化量の変化（それぞれpTau、pAkt、pGSK-3 β ）を調べたウエスタンブロットの結果を示す写真図である。「-」及び「+」はそれぞれ、ラット海馬ニューロンを培養液NM5及び培養液NM5にミミズ乾燥粉末を溶解した培養液（100ng/ml）で培養した結果を示す。尚、タウ蛋白はSer396、AktはSer473、及び、GSK-3 β はSer9をそれぞれリン酸化の指標として評価した。

40

【図2】図1に示すウエスタンブロットの結果から画像解析ソフトImageJ64を用いて定量したタウ蛋白（Tau）、Akt及びGSK-3 β の濃度、並びに、これらがリン酸化したpTau、pAkt及びpGSK-3 β の濃度を示すグラフである。Aは左から、 α -アクチンを基準としたpTauの濃度及びタウ蛋白の濃度並びにタウ蛋白に対するpTauの比率、Bは左から α -アクチンを基準としたAktの濃度及びpAktの濃度並びにAktに対するpAktの比率、並びに、Cは左から α -アクチンを基準としたGSK-3 β の濃度及びpGSK-3 β の濃度並びにGSK-3 β に対するpGSK-3 β の比率を示す。

【図3】ミミズ乾燥粉末溶解培養液中の培養（48時間、37℃）による、ラット海馬ニ

50

ューロンのタウ蛋白 (Tau) 及び α -アクチンの産生量の、ミミズ乾燥粉末溶解濃度による変化を調べたウエスタンブロットの結果を示す写真図 (A)、並びに、画像解析ソフト Image J 64 を用いて定量した α -アクチンを基準としたタウ蛋白の濃度変化を示すグラフ (B) である。

【図4】ミミズ乾燥粉末溶解培養液中の培養 (37℃、ミミズ乾燥粉末溶解濃度 100 ng/ml) による、ラット海馬ニューロンのタウ蛋白 (Tau) 及び α -アクチンの産生量の、培養時間による変化を調べたウエスタンブロットの結果を示す写真図 (A)、並びに、画像解析ソフト Image J 64 を用いて定量した α -アクチンを基準としたタウ蛋白の濃度変化を示すグラフ (B) である。

【図5】培養液 NM5 および培養液 NM5 にミミズ乾燥粉末を溶解した培養液 (100 ng/ml) で 48 時間 37℃ で培養したラット海馬ニューロン中のタウ蛋白 (Tau) 及び pTau を免疫染色した蛍光写真図である。上段 (None) は培養液、下段 (RW) はミミズ乾燥粉末溶解培養液で培養した蛍光写真図を示す。左側がタウ蛋白の蛍光写真図、中央が pTau の蛍光写真図、並びに、右側がタウ蛋白及び pTau の蛍光写真図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本発明方法においては、原料用いられるミミズは特に限定されず、例えばアカミミズ (*Lumbricus rubellus*)、LTミミズ (*Lumbricus terrestris*)、シマミミズ (*Eisenia foetida*)、カッシュクツリミミズ (*Allolobophora caliginosa*)、ムラサキツリミミズ (*Dendrobaena octaedra*)、サクラミミズ (*Allolobophora japonica Michaelsen*)、ハッタミミズ (*Drawida hattamimizu Hatai*)、セグロミミズ (*Pheretima divergens Michaelsen*)、フツウミミズ (*Pheretima communissima*)、ハタケミミズ (*Pheretima agrestis*)、シーボルトミミズ (*Pheretima sieboldi Horst*)、ヒトツモンミミズ (*Pheretima hilgendorfi*)、イソミミズ (*Pontodrilus matsushimensis Iizuka*)、イトミミズ (*Tubifex hattai Nomura*)、ゴトウイトミミズ (ユリミミズ) [*Limnodrilus goittoi Hatai = L. Socialis Stephenson*] などを用いることができる。

【0021】

本発明において、ミミズの乾燥粉末とは、未処理の又は前処理をしたミミズの摩砕物又は抽出物を乾燥して得た粉末を意味する。また、ミミズの摩砕物とは、未処理の又は前処理をしたミミズを摩砕した液状ないしペースト状のものである。ミミズの抽出物とは、未処理の又は前処理をしたミミズ又はその摩砕物を、水または有機溶媒に溶解し、不溶性画分を除去または分離して得たエキスを意味する。前記前処理は特に限定されるものではなく、後述する汚物等の除去処理等が挙げられる。また、ミミズの乾燥粉末、摩砕物および抽出物は後処理がされていてもよく、後処理としては造粒、濾過、精製、濃縮、希釈および pH 調製等が挙げられる。

【0022】

ミミズの摩砕物を得るための摩砕方法は特に限定されず、例えば、ホモジナイザー、ブレンダー、ホモキサー、擂潰機、加圧型細胞破壊装置等を用いて摩砕することができる。

【0023】

ミミズの抽出物を得るための抽出方法は特に限定されず、例えば、ミミズの乾燥粉末又は摩砕物を抽出溶媒に溶解し、不溶性画分を除去又は分離して抽出することができる。抽出溶媒としては、水、水溶液並びにエタノール、アセトン及び酢酸エチル等の有機溶媒が挙げられ、1種を単独で、又は、2種以上を組み合わせてもよい。中でも、水、エタノー

10

20

30

40

50

ル又はエタノール水溶液が好ましい。

【0024】

ミミズの乾燥物を得るための乾燥方法は特に限定されず、凍結乾燥、加熱乾燥及び噴霧乾燥等の乾燥方法により乾燥することができる。中でも、後述の理由により、凍結乾燥が好ましい。

【0025】

本発明において、ミミズの乾燥粉末、摩砕物または抽出物は、その目的に合わせて効果的な量を配合すればよい。適切な配合量は、目的、投与経路及び形態、ミミズの乾燥粉末等の製造方法等の様々な因子に依存するが、後述するミミズの消化管内に残留する消化物、体皮に付着する汚物等を除去した後、ミミズを摩砕し、摩砕物を凍結乾燥して得られたミミズの乾燥粉末の重量に換算して、タウ蛋白の欠乏に起因する疾患の予防又は軽度の疾患の治療を目的としては、好ましくは1日あたり1～15,000mg、より好ましくは1日あたり12～1,800mg、さらに好ましくは1日あたり120～180mgである。また、タウ蛋白の欠乏に起因する重度の疾患の治療を目的としては、好ましくは1日あたり1～15,000mg、より好ましくは1日あたり18～3,600mg、さらに好ましくは1日あたり180～360mgである。

10

【0026】

本発明のタウ蛋白産生促進剤、治療薬、予防薬及び食品組成物の形状は特に限定されず、固形、粉末、半固形及び液体のいずれでもよい。

【0027】

本発明において、ミミズの乾燥粉末、摩砕物または抽出物はそのまま使用することができる。また、特に本発明のタウ蛋白産生促進剤、治療薬及び予防薬においては、薬学的に許容しうる担体を含んでもよく、例えば錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、ソフトカプセル剤、液剤、注射剤、坐剤、徐放剤等として、経口的または非経口的（例えば、静脈投与、直接患部に投与等）に投与することができる。薬学的に許容しうる担体としては、賦形剤、結合剤、崩壊剤、流動化剤、滑沢剤、コーティング剤、懸濁化剤、着色剤、甘味剤または界面活性剤等を用いることができ、公知の方法に従って一般的な医薬製剤の形態とすることができる。また、他の治療・予防成分や薬学的に許容しうる添加剤を含んでもよい。

20

【0028】

また、本発明、特に本発明のタウ蛋白産生促進剤及び食品組成物においては、食品に通常に使用される添加剤を含んでもよい。例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、流動化剤、滑沢剤、コーティング剤、懸濁化剤、着色剤、甘味剤または界面活性剤等を用いることができ、公知の方法に従って一般的な食品組成物の形態とすることができる。また、他の食品又は食品由来の成分を含んでもよい。

30

【0029】

本発明において、ミミズの乾燥粉末、摩砕物及び抽出物の中でも、製造工程における保存安定性の観点から、ミミズの乾燥粉末を用いることが好ましい。ミミズの乾燥粉末は、予め水等の液体に溶解及び/又は分散させてから、薬学的に及び又は食品に使用される通常の担体、添加剤等の他の成分と混合してもよい。

40

【0030】

本発明において、タウ蛋白の欠乏に起因する疾患は特に限定されないが、タウオパチーであることが好ましく、アルツハイマー病、ピック病、大脳皮質変性症、進行性核上性麻痺、慢性外傷性脳症、17番染色体に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症、グアム パーキンソン痴呆複合、アミロイド班無しのアルツハイマー病類似の神経原線維変化を伴う神経原線維変化優位型老年期認知症、神経節膠腫、神経節細胞腫、亜急性硬化性全脳炎、結節性硬化症、ハレルフォルデン-スパッツ病、前頭側頭認知症、前頭側頭葉変性症からなる群より選択されることがより好ましい。特に好ましくは、アルツハイマー病である。

【0031】

50

ミミズを原料として経口投与するためには、ミミズの消化管内に残留する消化物、体皮に付着する汚物等を除去することが好ましい。本発明においては、除去方法は特に限定されず、公知の方法を用いて除去することができる。例えば、ミミズ生体をナトリウム塩又はカリウム塩のようなアルカリ塩の水溶液中に浸せきして、消化管内の糞土を排泄させる方法（特開平1-47718号公報、特開平1-47719号公報、特開平1-47720号公報および特開平1-268639号公報に記載の方法）、ミミズ生体を6~26に維持した酸水溶液中に0.1~5時間放置して消化管内の糞土を除去する方法（特開平3-72427号公報に記載の方法）などを用いることができる。

【0032】

本発明においては、除去方法として、下記の金属の塩化物および/またはヒドロキシカルボン酸とミミズとを接触させることが好ましい。

【0033】

上記金属の塩化物は、カリウム、ナトリウム、マグネシウムおよびカルシウムからなる群から選ばれる少なくとも1種の金属の塩化物である。即ち、塩化カリウム、塩化ナトリウム、塩化マグネシウムおよび塩化カルシウムからなる群から選ばれる少なくとも1種である。また、これらの混合物でもよく、これらと、食品への添加が可能な他の無害な成分との混合物であってもよい。そのような混合物としては、例えば食塩、岩塩、天日塩が挙げられる。上記金属の塩化物は、粉末状のものを生ミミズにふりかけることにより用いることができ、これによりミミズと金属の塩化物の接触が起きる。

【0034】

生ミミズに上記金属の塩化物を接触させた後、生ミミズと下記のようにヒドロキシカルボン酸を接触させることが好ましい。また、上記金属の塩化物との接触をさせずに、下記のようにヒドロキシカルボン酸とミミズとの接触を行うこともできる。

【0035】

上記ヒドロキシカルボン酸との接触についても、粉末状のヒドロキシカルボン酸を生ミミズにふりかけることにより行うことができる。また、pH2~5のヒドロキシカルボン酸水溶液中に浸漬してもよい。金属の塩化物との接触を経てからヒドロキシカルボン酸との接触を行う場合は、ヒドロキシカルボン酸との接触は、上記金属の塩化物との接触の後速やかに行うことが好ましい。また、生ミミズとヒドロキシカルボン酸とを接触させる前に、ミミズを水洗することが好ましい。水洗により上記金属の塩化物を除いてからミミズとヒドロキシカルボン酸とを接触させると酵素活性の高いミミズ乾燥粉末が得られる。ヒドロキシカルボン酸との接触前に水洗を行う場合は、金属の塩化物との接触開始後、好ましくは30分、より好ましくは20分以内に水洗を行う。水洗方法は特に限定されず、公知の方法を採用することができる。

【0036】

生ミミズを長時間ヒドロキシカルボン酸粉末と接触させておくと死滅し、生活機能を消失し、消化管内の消化物を排泄しなくなるので、可及的速やかに、好ましくは30秒以内、より好ましくは20秒以内にヒドロキシカルボン酸を水で希釈し、pHを2~5の範囲に調整することが好ましい。

【0037】

ヒドロキシカルボン酸はミミズにとって不快生活環境を形成するため、生ミミズは、自己保存本能により体液、排泄物を放出して生活環境を改善しようとする。また、ヒドロキシカルボン酸は殺菌性を有するため、上記のように消化器内に残留する消化物等の排泄を促す役割を果たすとともに、ミミズに付着した雑菌を殺菌するという効果が期待できる。

【0038】

上記方法において用いられる結晶状ヒドロキシカルボン酸は、使用条件下で結晶状体を示すものであれば、そのヒドロキシ基数又はカルボキシル基数には関係なく用いることができる。すなわち、モノヒドロキシモノカルボン酸、モノヒドロキシポリカルボン酸、ポリヒドロキシモノカルボン酸、ポリヒドロキシポリカルボン酸のいずれでもよい。

【0039】

10

20

30

40

50

本発明で用いるヒドロキシカルボン酸としては、例えば、グリコール酸、乳酸、酢酸、ヒドロキシプロピオン酸、ヒドロキシ n 酪酸、ヒドロキシ n 酪酸、ヒドロキシ n 吉草酸、ヒドロキシ n 吉草酸、リンゴ酸、メチルリンゴ酸、ヒドロキシグルタル酸、ヒドロキシグルタル酸、クエン酸、マロン酸およびコハク酸などが挙げられる。中でも食品に対して使用可能で入手が容易である点で乳酸、酢酸、リンゴ酸、クエン酸、マロン酸およびコハク酸が好ましい。ヒドロキシカルボン酸は、1種を単独で用いてもよいし、2種以上を混合して用いてもよい。

【0040】

生ミミズの組織の65%は水分である。生ミミズの保身機能が働く時間としては、ある程度余裕はあるが、生ミミズが死滅してしまうと酵素が働いてしまうので、不快生活環境下に置く時間の制御は慎重に行う必要がある。この時間は、条件により左右されるが、通常は3~180分の範囲である。

10

【0041】

ヒドロキシカルボン酸で処理したミミズ生体は、水で洗浄したのち、摩砕して液状ないしペースト状の摩砕物にすることが好ましい。洗浄は好ましくは純水で行う。洗浄方法は特に限定されず、公知の水洗方法を採用することができる。また、摩砕前の処理工程の合計時間、即ち、生ミミズに金属の塩化物を振りかけてから、ヒドロキシカルボン酸の水による洗浄を終えるまでの時間は、合計で240分以内が好ましい。

【0042】

上記摩砕方法は特に限定されず、例えば、ホモジナイザー、ブレンダー、ホモミキサー、擂潰機、加圧型細胞破壊装置を用い、通常1~25で行われる。ミミズ構成成分の分解抑制の観点から低温下で行うことが好ましく、2~15の温度が好ましい。

20

【0043】

ミミズの摩砕により得られた摩砕物は、例えばステンレス鋼製トレーに収容され、凍結乾燥に付される。この際、ミミズ生体に含まれる酵素は、生細胞には作用しないが死細胞に対しては瞬時に作用するため、腐敗性ガスが発生するおそれがあり、これを防止するために瞬間的に-18~-35に急冷・凍結して酵素の作用を抑制した後に、凍結乾燥を行うことが好ましい。

【0044】

このように、ミミズ本来の薬理作用を損なわずに粉末化するには、迅速に凍結することが好ましいが、一方においてあまり短時間で凍結させるとミミズペーストの主成分であるタンパク質とともに存在する不純物がスポット状の不凍結部分を形成し、分離されないことがあるので、過度に急速な凍結は好ましくない。したがって、凍結は好ましくは-18から-35の低温で20~240時間、より好ましくは50~170時間を要して行う。

30

【0045】

凍結乾燥に際しては、水分とともに不純分が残留することなく除去し得る条件を選ぶことが重要である。そのためには、圧力50Pa以下、-60ないし+90の温度において、温度を段階的に上げながら10~60時間の範囲で制御して行うのが好ましい。

【0046】

凍結乾燥の方法としては、例えば、前記したように摩砕物を-18ないし-35の温度で20~240時間を要して凍結したのち、-60~+90の温度において、数段階に分け昇温し、圧力25~40Paにおいて、数段階に分け減圧しながら、10~60時間凍結真空乾燥させることで無菌状態の淡黄色ミミズ乾燥粉末を得ることができる。

40

【0047】

さらに、前記摩砕物を凍結乾燥したものを水またはエタノール水溶液に溶解し、不溶性画分を除去または分離する工程を備えることが好ましい。不溶性画分を除去または分離する工程は、上記と同様に、放置による沈殿、遠心、濾過等によることができる。水またはエタノール水溶液に溶解する工程は、攪拌ないし振とうしながら行うことが好ましい。水への溶解に要する時間は好ましくは、1~120分間、より好ましくは5~80分間であ

50

る。エタノール水溶液のエタノール濃度は特に制限されないが、好ましくは10～70% (v/v)、より好ましくは30～60%である。

【0048】

本発明のタウ蛋白産生促進剤、治療薬、予防薬及び食品組成物は、上記のように水またはエタノール水溶液に溶解したものの上清を、そのまま水溶液の状態でもよく、水分を飛ばして濃縮液として用いてもよく、乾燥させて粉末状にして用いることもできる。上清を乾燥して粉末状にしたものを水に溶解して用いてもよい。また、ミミズペーストを凍結乾燥した粉末を、水またはエタノール水溶液に溶解せずにそのまま用いることもできる。

【0049】

また、本発明においては、除去方法としては、生ミミズを不快環境下に置く処理の前、即ち上記の生ミミズを金属の塩化物またはヒドロキシカルボン酸に接触させるのに先立ち、生ミミズをパン箱のような平箱に移し、明所にて10～50時間放置し、体皮に付着した汚物を除去することが好ましい。明所での放置時間は、より好ましくは12～24時間である。この際の収容量としては、ミミズが30～60mm、好ましくは40～50mmの厚さに積み重なる程度の量が好ましい。この平箱内には、砂、泥のような異物が存在しないようにし、またミミズは夜行性で暗所では生活活動が活発となり、体力を消耗するおそれがあるため、夜間は電照培養方式などにより明るく保つことが好ましい。この処置により生ミミズは、自己防御本能を発揮し、消化管内に残留する消化物を排泄し、この排泄物で全身を覆い、水分が蒸発するのを防いで、生活環境を維持しようとするので、この覆

【0050】

ミミズの体皮に付着した汚物の剥ぎ取りは、例えば不織布で生ミミズを被覆し、汚物をそれに吸着させて行うことができる。この明所での放置および体皮に付着した汚物の除去と、上記の金属の塩化物および/またはヒドロキシカルボン酸との接触とを組み合わせることにより、一層のミミズ体内の有毒物の排出、除去が期待できる。

【0051】

本発明において、ミミズの乾燥粉末を得る方法としては、特に乾燥粉末の保存安定性の観点から、下記の方法が好ましい。

(A-1) 生ミミズをカリウム、ナトリウム、マグネシウムおよびカルシウムからなる群から選ばれる少なくとも1種の金属の塩化物と接触させ、

その後、粉末状ヒドロキシカルボン酸と生ミミズとを接触させ、水で希釈してpH2～5に調整し、3～180分間保持した後、生ミミズを水洗し、摩砕し、得られた摩砕物を凍結乾燥する工程を備えるミミズの乾燥粉末の製造方法。

(A-2) 生ミミズをカリウム、ナトリウム、マグネシウムおよびカルシウムからなる群から選ばれる少なくとも1種の金属の塩化物と接触させ、

その後、生ミミズをpH2～5に調整したヒドロキシカルボン酸水溶液中に浸漬し、3～180分間保持したのち、生ミミズを水洗し、摩砕し、得られた摩砕物を凍結乾燥する工程を備えるミミズの乾燥粉末の製造方法。

(A-3) 前記(A-1)又は(A-2)において、前記摩砕物を凍結乾燥したものを水またはエタノール水溶液に溶解し、不溶性画分を除去または分離した後、さらに凍結乾燥する工程を備えるミミズの乾燥粉末の製造方法。

【0052】

また、生ミミズを摩砕してなる摩砕物を凍結乾燥した後、乾燥物の殺菌の観点から、得られた乾燥物を110以上130未満で加熱処理することが好ましい。加熱温度が110未満であると、乾燥物の殺菌が不十分なことがあり、130以上であるとミミズ乾燥物に含まれる酵素が失活してしまい活性が下がるので好ましくない。より好ましくは、115～125である。加熱方法は特に限定されず、熱風をかける方法、加熱ジャケットを用いる方法、トレイ等に載せてヒーターで加熱する方法、定温恒温器を使用する方

10

20

30

40

50

法などが挙げられる。加熱時間は好ましくは、30秒～130分、より好ましくは、30分～90分さらに好ましくは60分～90分である。加熱時間があまり短いと殺菌が不十分な場合があり、あまり長いと酵素の活性が失われるため好ましくない。尚、液体中の酵素に上記加熱処理を行うと酵素活性が失われてしまうことから、本発明においては、ミミズの乾燥粉末を用いることが好ましい。

【0053】

本発明において、ミミズの摩砕物を得る方法としては、下記の方法が好ましい。

(B-1) 生ミミズをカリウム、ナトリウム、マグネシウムおよびカルシウムからなる群から選ばれる少なくとも1種の金属の塩化物と接触させ、

その後、粉末状ヒドロキシカルボン酸と生ミミズとを接触させ、水で希釈してpH2～5に調整し、3～180分間保持した後、生ミミズを水洗し、摩砕する工程を備えるミミズの摩砕物の製造方法。

(B-2) 生ミミズをカリウム、ナトリウム、マグネシウムおよびカルシウムからなる群から選ばれる金属の塩化物と接触させ、

その後、生ミミズをpH2～5に調整したヒドロキシカルボン酸水溶液中に浸漬し、3～180分間保持したのち、生ミミズを水洗し、摩砕する工程を備えるミミズの摩砕物の製造方法。

【0054】

本発明において、ミミズの抽出物を得る方法としては、下記の方法が好ましい。

(C-1) 生ミミズをカリウム、ナトリウム、マグネシウムおよびカルシウムからなる群から選ばれる少なくとも1種の金属の塩化物と接触させ、

その後、粉末状ヒドロキシカルボン酸と生ミミズとを接触させ、水で希釈してpH2～5に調整し、3～180分間保持した後、生ミミズを水洗し、摩砕し、得られた摩砕物を凍結乾燥したものを、水またはエタノール水溶液に溶解し、不溶性画分を除去または分離する工程を備えるミミズの抽出物の製造方法。

(C-2) 生ミミズをカリウム、ナトリウム、マグネシウムおよびカルシウムからなる群から選ばれる金属の塩化物と接触させ、

その後、生ミミズをpH2～5に調整したヒドロキシカルボン酸水溶液中に浸漬し、3～180分間保持したのち、生ミミズを水洗し、摩砕し、得られた摩砕物を凍結乾燥したものを、水またはエタノール水溶液に溶解し、不溶性画分を除去または分離する工程を備えるミミズの抽出物の製造方法。

【実施例】

【0055】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。本発明は、以下の実施例により何ら制限されるものではない。尚、以下において「%」とあるのは、特に断りのない限り全て質量基準である。

【0056】

[ミミズ乾燥粉末の調製]

24時間明所に放置後、体皮に付着する汚物を剥ぎ取った生のアカミミズ30kgを平皿に約5cmの厚さに拡げ、この上に塩化ナトリウム250gを均一に振りかけた。20分後、ミミズを水洗した。その後、クエン酸250gを同様に振りかけた後15秒で純水30リットルを加えて希釈した。この時、水を加えた直後のpHは2.25であり、完全に希釈したときのpHは2.74であった。クエン酸粉末を振りかけると、ミミズは一気に黄色い体液を放出した。水で希釈した後に、その状態で20分間保持した。次いで、汚れたクエン酸水溶液から生ミミズを取り出し、水洗したのち、ホモジナイザーを用いて10において摩砕し、ミミズペーストを調製した。次に、このミミズペーストを吸引脱気して、その中に含まれているガスを除いたのち、ステンレス鋼製トレーに移し、瞬間的に-35℃まで急冷し、この温度に50時間維持して徐々に凍結した。凍結したミミズペーストを-35℃で圧力0Paを2時間保ったのち、温度25℃まで昇温し、40Paで10時間、次いで40℃、圧力35Paで14時間、次いで65℃、圧力35Paで12

10

20

30

40

50

時間乾燥し、最後に温度を80℃とし、圧力25Paにおいて6時間保つことにより真空凍結乾燥を行った。この処理により含水量8質量%の淡黄色のミミズ乾燥粉末を得た。

【0057】

上記で得られたミミズ乾燥粉末を、RM50D型加熱装置(株式会社大河原製作所製)を用いて加熱処理を行った。加熱条件は、90分かけて120℃まで加熱した後、120℃で20分間加熱し、240分かけて40℃まで冷却した後、ミミズ乾燥粉末を取り出した。

加熱処理したミミズ乾燥粉末を、50%エタノール水溶液に、エタノール：凍結乾燥粉末が20：1(v/w)となるように溶解し、室温(25℃)下、1500rpmで1時間振とうした。その後、4℃、10000×gで15分間遠心し、上清を分離して、75℃で15分間減圧濃縮した。得られた上清をステンレス鋼製トレーに移し、瞬間的に-35℃まで急冷し、この温度に50時間維持して徐々に凍結した。凍結したミミズペーストを-35℃で圧力0Paを2時間保ったのち、温度25℃まで昇温し、40Paで10時間、次いで40℃、圧力35Paで14時間、次いで65℃、圧力35Paで12時間乾燥し、最後に温度を80℃とし、圧力25Paにおいて6時間保つことにより真空凍結乾燥を行い、ミミズ乾燥粉末A-1を得た。

【0058】

[ラット海馬ニューロン培養]

妊娠18日目ラット胎児の海馬領域から単離した神経細胞(ニューロン)を、7日間37℃で培養した。

【0059】

[タウ蛋白量およびリン酸化タウ蛋白量測定]

上記で培養したラット海馬ニューロンを、上記で得たミミズ乾燥粉末A-1がそれぞれ0、1、10、100及び1000ng/mLになるように培養液Neural Media 5(NM5)で溶解して得たミミズ凍結乾燥粉末溶解培養液1mL中(細胞数 1×10^6 /12well dish)で37℃で培養した。培養液NM5の組成は以下の通りである。

230mL Neurobasal(Gibco 21103-049)

12.5mL Horse Serum(Sigma H1270)

2.5mL penicillin/streptomycin(Gibco 15140122)

5mL Glutamax 1(Gibco 35050-061)

2% B27 supplement(Gibco 17504044)

その後、任意の時間の経過後にラット海馬ニューロンを採取し、PBS液(-)液で2回洗浄し、サンプルバッファー液で調整した後、タウ蛋白量およびタウ蛋白のリン酸化量をウエスタンブロット法により評価した。蛋白量及びリン酸化量は、ウエスタンブロットの結果から、画像解析ソフトImageJ64を用いて測定した。同様に、タウ蛋白よりシグナル上流に位置する分子Akt及びGSK-3に関して、蛋白量及びリン酸化量を評価した。

【0060】

ミミズ乾燥粉末溶解培養液中で培養したラット海馬ニューロンにおいて、Akt及びGSK-3の蛋白量に有意な増加は認められなかったが(図1、2B及び2C)、タウ蛋白量は増加し、コントロール(「-」;培養液NM5で培養)と比較して蛋白量が2倍以上も産生されることがわかった(図1、2A)。また、ミミズ乾燥粉末溶解培養液によるタウ蛋白量の増加は、ミミズ乾燥粉末濃度100ng/mL、培養時間48時間で最大の増加量を示した(図3、4)。

【0061】

[タウ蛋白およびリン酸化タウ蛋白の細胞内局在]

上記で培養したラット海馬ニューロンを、上記で得たミミズ乾燥粉末A-1が100ng/mLになるように培養液NM5で溶解して得た溶液2mL中(細胞数 2×10^5 /6

10

20

30

40

50

well dish (底面にカバーガラス)) で37 で培養した。

その後、48時間後にラット海馬ニューロンを採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、タウ蛋白およびリン酸化タウ蛋白の細胞内局在を免疫染色法により検討した。

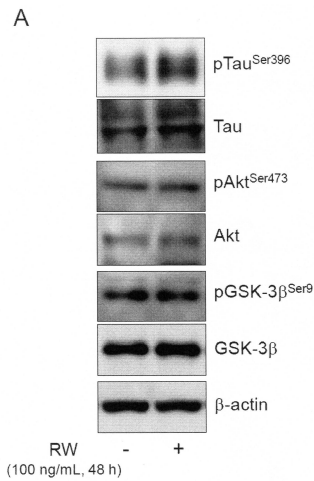
【0062】

コントロール(「None」; 培養液NM5で培養)では、神経突起部位までタウ蛋白のリン酸化が鮮明に確認できたが、ミミズ乾燥粉末溶解培養液で培養した海馬ニューロンでは、突起部位に鮮明なリン酸化像は確認できなかった(図5)

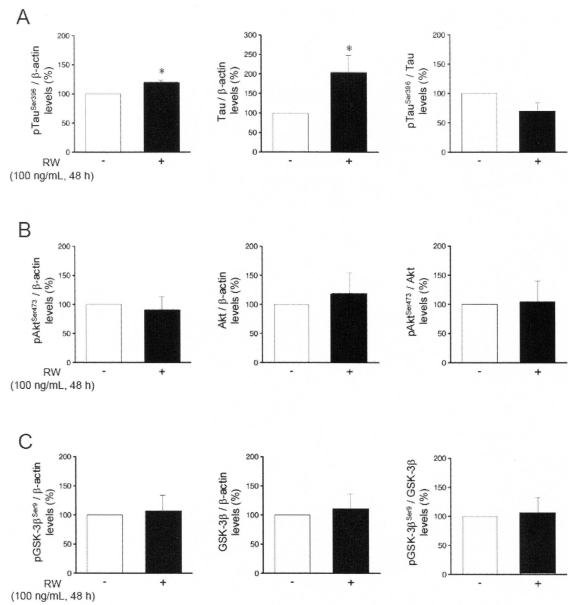
【0063】

以上の結果から、ミミズ乾燥粉末はタウ蛋白の蛋白量を有意に増加させ、とりわけ神経突起部位においてはリン酸化量を減少させることがわかる。

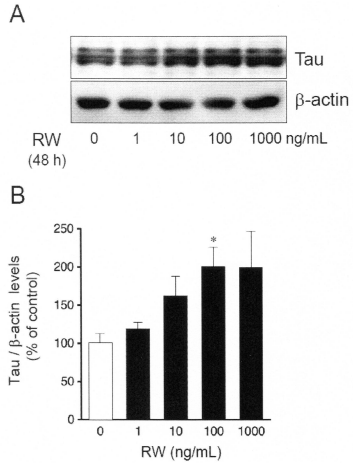
【図1】



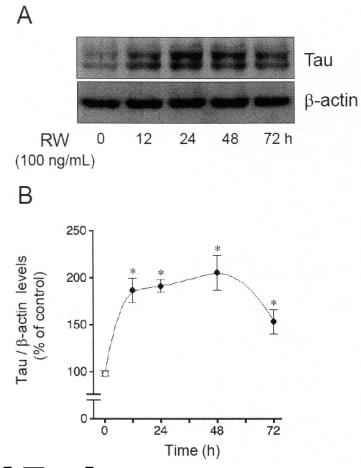
【図2】



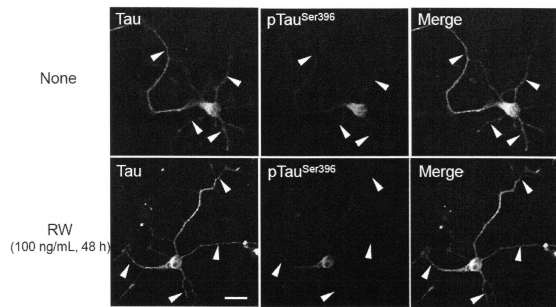
【 3 】



【 4 】



【 5 】



フロントページの続き

(72)発明者 根本隆行

宮崎県宮崎市清武町木原5200 国立大学法人宮崎大学医学部機能制御学講座薬理学分野

(72)発明者 岡本 猛

岡山県倉敷市西阿知町西原1046-6 グリーンピアもりあ102号

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 中国特許第103550537(CN, B)

中国特許第103251884(CN, B)

国際公開第2013/018587(WO, A1)

特許第6195962(JP, B2)

特許第6002331(JP, B2)

J Pharm Pharmacol., 2006年, 58(7), 989-96

Drug Discovery Today, 2010年, 15(21/22), p.966-972

Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999年, 63(11), p.2031-2033

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 35/00 - 35/768

WPI

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)