【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第３部門第２区分
【発行日】平成16年12月16日(2004.12.16)

【公開番号】特開2001-294531(P2001-294531A)
【公開日】平成13年10月23日(2001.10.23)
【出願番号】特願2000-325352(P2000-325352)
【国際特許分類第７版】
　Ａ６１Ｋ　35/64
　Ａ２３Ｌ　 1/076
　Ａ２３Ｌ　 1/30
　Ａ６１Ｋ　38/00
　Ａ６１Ｐ　43/00
// Ａ２３Ｌ　 2/52
　Ａ２３Ｌ　 2/38
　Ｃ０７Ｋ　14/435
【ＦＩ】
　Ａ６１Ｋ　35/64
　Ａ２３Ｌ　 1/076
　Ａ２３Ｌ　 1/30　　Ａ
　Ａ６１Ｐ　43/00　１０５
　Ａ６１Ｋ　37/02
　Ａ２３Ｌ　 2/00　　Ｆ
　Ａ２３Ｌ　 2/38　　Ｎ
　Ｃ０７Ｋ　14/435　ＺＮＡ

【手続補正書】
【提出日】平成15年12月26日(2003.12.26)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】請求項３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【請求項３】
ローヤルゼリーが下記に示される特性を有する蛋白質をローヤルゼリー全蛋白質あたり９重量％以上含有するものであることを特徴とする、請求項１に記載の補気剤。
１）ローヤルゼリー中の蛋白質の非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一バンドを形成する。
２）還元条件下でのＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定される分子量が約５７キロダルトンである。
３）配列式１のアミノ酸番号１～８のアミノ酸配列を含む。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０００５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０００５】
【課題を解決するための手段】
この様な状況に鑑みて、現代人に於ける気力減退などの気虚を改善する手段を求め、鋭意研究を重ねた結果、ローヤルゼリーにその様な作用を見出し、発明を完成させるに至った

。更に、研究を重ねた結果、この様な作用の有効成分が後述する５７キロダルトンの蛋白質であることを見出し、この様な成分を含有する組成物を投与することにより、前記気虚が改善しうることを見出し、発明を更に発展させた。即ち、本発明はローヤルゼリー及び／又はその有効成分である５７キロダルトンの蛋白質からなる補気剤を提供するものである。加えて、本発明は、前記補気剤を含有する医薬や食品などの気力充実用の組成物を提供するものである。即ち、本発明は以下に示す技術範囲に関する。
（１）ローヤルゼリー及び／又はその有効成分からなる補気剤。
（２）ローヤルゼリーの有効成分が次に示される特性を有する蛋白質であることを特徴とする、（１）に記載の補気剤。
１）ローヤルゼリー中の蛋白質の非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一バンドを形成する。
２）還元条件下でのＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定される分子量が約５７キロダルトンである。
３）配列式１のアミノ酸番号１～８のアミノ酸配列を含む。
（３）ローヤルゼリーが下記に示される特性を有する蛋白質をローヤルゼリー全蛋白質あたり９重量％以上含有するものであることを特徴とする、（１）に記載の補気剤。
１）ローヤルゼリー中の蛋白質の非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一バンドを形成する。
２）還元条件下でのＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定される分子量が約５７キロダルトンである。
３）配列式１のアミノ酸番号１～８のアミノ酸配列を含む。
（４）（１）～（３）何れか１項に記載の補気剤を含有する、気力充実用の組成物。
（５）食品又は医薬品であることを特徴とする、（４）に記載の組成物。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０００６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０００６】
【発明の実施の形態】
（１）本発明の補気剤であるローヤルゼリー及びその有効成分
本発明の補気剤はローヤルゼリー及び／又はその有効成分よりなる。ローヤルゼリーの化学的組成は、生産地により、多少の差異はあるが、水分６５～７０％、蛋白質１５～２０％、炭水化物１０～１５％、脂肪１．７～６％、灰分０．７～２％含むとされている。ローヤルゼリーに於いては、後記に示す如く乳酸の組織への蓄積を防ぎ、血中へのエネルギー物質であるグルコースの放出を促し、組織が糖質不足になることを抑制し、エネルギー産生によって生じたアンモニアなどの有害物質を毒性の少ない代謝物に速やかに変換させ、体のシステム全体を活動的に調整する作用、即ち、優れた気力充実作用を有する。この様な作用は、生体全体に及ぶことは勿論、ここの細胞にも作用し、結果細胞の増殖を促進する作用として観察される。この様な作用の起因物質は、従来からローヤルゼリーの有効物質といわれていた、ヒドロキシデセン酸やビタミン類とはことなり、下記の１）～３）に示す特性を有する蛋白質であることを本発明者らは見出している。本明細書においてこの蛋白を唯単に「５７キロダルトンの蛋白質」ということがある。本発明の補気剤として使用するローヤルゼリーにはこの蛋白質が含まれていることが重要であり、好ましい含有量としてはローヤルゼリー中の全蛋白量に対して５重量％以上、更に好ましい含有量として９重量％以上が例示できる。勿論、本発明の補気剤としては、下記に示す１）～３）の特性を有する蛋白質、即ち５７キロダルトンの蛋白質を単離精製して用いても良い。
１）ローヤルゼリー中の蛋白質の非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一バンドを形成する。
２）還元条件下でのＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定される分子量が

約５７キロダルトンである。
３）配列式１のアミノ酸番号１～８のアミノ酸配列を含む。
【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１５】
【表３】

投与群	遊泳時間(分)
コントロール	16:35±6:30
ローヤルゼリー(57kDa 11.6%)	22:24±6:30
劣化ローヤルゼリー(57kDa 4.9%)	16:22±6:42

【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１７】
【表４】

投与群	血中乳酸値(mM)
コントロール	4.05±0.15
ローヤルゼリー(57kDa 11.6%)	3.86±0.24
劣化ローヤルゼリー(57kDa 4.9%)	4.01±0.10

【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１８】
＜実施例４＞
ローヤルゼリーのマウスに対する血中アンモニア量の維持作用
（実験方法）
実施例１～３と同様にマウス運動量測定流水槽を用いることにより、過剰な運動時における、血中のアンモニア量を維持する作用を測定した。ローヤルゼリー（５７キロダルトンの蛋白質１１．６％含有）を乾燥重量０．７ｇ／ｋｇで遊泳前４８，２４，０．５時間前に経口投与し、１群１０匹のマウスを１５分間遊泳させた後、１０分間休息後、再度ローヤルゼリーを同量投与し、更に２０分間休息した後、１５分間遊泳させた後、採血し血中のアンモニア値をアンモニア・テストワコー（和光純薬社製）を用いることにより測定した。尚、分子量５７キロダルトンの蛋白質含量が全蛋白質含量に対して４．９重量％である劣化ローヤルゼリー投与群とコントロール実験としてローヤルゼリー非投与のものも同様に実験を行った。結果を表５に示す。これより、ローヤルゼリーを投与すると過剰な運

動を負荷しても、生成するアンモニアが速やかに尿素に変換されるため、有害なアンモニアの形で血中に残存していないことがわかる。これは、ローヤルゼリーの補気作用により、アンモニア代謝系であるオルニチン回路が気力充実・活性化しているためである。これにより、本発明の補気剤であるローヤルゼリーの効果が明確である。更にこの作用は５７キロダルトンの蛋白質の含有量に用量依存しており、この蛋白が補気作用の有効成分であることもわかる。

【手続補正７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２０】
＜実施例５＞
５７キロダルトンの蛋白質のラット初代培養肝細胞に対する効果
（培養方法）
ウィスター系ラット７週齢（体重：約１５０ｇ）の肝臓をハンクスバッファーにて潅流後、コラゲナーゼ溶液で潅流し肝細胞を得た。これを下記に示す培地I（表６）で２回洗浄し、更に、下記に示す培地II（表７）で溶解しトリパンブルー染色し細胞数を測定した。後に、３７℃、３時間、CO_2インキュベーターで培養し、培地交換を下記に示す培地III＋サンプル（表８、９）で行い、３７℃、５日間、CO_2インキュベーターで培養した。尚、培地交換及び細胞数測定は毎日行った。表１０に示したように、本発明の補気剤である５７キロダルトンの蛋白質は、初代培養肝細胞の維持に優れることがわかる。このことは、即ち、肝臓保護剤無しでは維持できない肝細胞が、本発明の補気剤を含有することにより、維持しうることを意味し、即ち、本発明の補気剤が、肝細胞に気を与え、生存条件を整える作用が有ることを意味する。

【手続補正８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２６】
＜実施例６＞
肝炎各病型に対応する病態モデルとして、四塩化炭素による中毒性肝障害モデルを用いて肝疾患治療に有効な物質の評価を行った。即ち、予備飼育後のラットに５０％四塩化炭素／オリーブ油を４ｍｌ／ｋｇ経口投与し、２０時間絶食させた後、精製した５７キロダルトンの蛋白質を被検物として５０ｍｇ／ｋｇ経口投与した。投与の方法は、被検物２００ｍｇを、１重量％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ１００の生理食塩水１０ｍｌに乳化させ、ゾンデで投与した。各群のラットは４匹とした。水と餌は四塩化炭素投与までの間自由に摂取させ、四塩化炭素投与後は絶食させ、水のみをそのまま与えた。被検物投与から２４時間後に採血し、血液は室温下で３０分放置した後、毎分３０００回転で１０分間遠心分離して血清を得た。

【手続補正９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２７】
この血清について、全ビリルビン（Ｔ－Ｂｉｌ）（Ｊｅｎｄｒａｓｓｉｋｉ法）、全コレステロール（Ｔ－Ｃｈｏ）（コレステロールオキシダーゼ法）、トリグリセリド（ＴＧ）（ＧＰＯ－ｐ－クロロフェノール法）、トランスアミナーゼ（ＧＯＴ，ＧＰＴ）（ＰＯＰ

－ＴＯＯＳ法）、アルカリホスファターゼ（Ａｌｐａｓｅ）（フェニルリン酸基質法）を和光純薬（株）製キットを用いて定量した。

【手続補正１０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２８】
各被検物投与群のＴ－Ｂｉｌ，Ｔ－Ｃｈｏ，ＴＧ，ＧＯＴ，ＧＰＴ及びＡｌｐａｓｅの値に対する影響を平均値として表１１に示す。尚、表１１の標準は四塩化炭素を投与しない群、コントロールは四塩化炭素を投与し被検物を投与しない群を示す。この表より、四塩化炭素の毒性に対して、本発明の補気剤は気を充実させ。肝細胞の生存能力を高め、四塩化炭素により傷害されることを防いでいることがわかる。