

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6170166号
(P6170166)

(45) 発行日 平成29年7月26日 (2017.7.26)

(24) 登録日 平成29年7月7日 (2017.7.7)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K	38/06	(2006.01)	A 6 1 K	38/06
A 6 1 K	31/198	(2006.01)	A 6 1 K	31/198
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	25/24	(2006.01)	A 6 1 P	25/24
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28

請求項の数 3 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-538828 (P2015-538828)
 (86) (22) 出願日 平成25年10月30日 (2013.10.30)
 (65) 公表番号 特表2015-535240 (P2015-535240A)
 (43) 公表日 平成27年12月10日 (2015.12.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2013/080052
 (87) 国際公開番号 W02014/069666
 (87) 国際公開日 平成26年5月8日 (2014.5.8)
 審査請求日 平成28年10月26日 (2016.10.26)
 (31) 優先権主張番号 特願2012-238541 (P2012-238541)
 (32) 優先日 平成24年10月30日 (2012.10.30)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 308032666
 協和発酵バイオ株式会社
 東京都千代田区大手町一丁目6番1号
 (74) 代理人 110002000
 特許業務法人栄光特許事務所
 (72) 発明者 熊谷 弘太
 茨城県つくば市御幸が丘2 協和発酵バイ
 オ株式会社 ヘルスケア商品開発センター
 内
 (72) 発明者 森田 匡彦
 茨城県つくば市御幸が丘2 協和発酵バイ
 オ株式会社 ヘルスケア商品開発センター
 内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳機能低下の予防または改善剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

シトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩を有効成分として含有する
 脳神経細胞保護剤。

【請求項 2】

シトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩を有効成分として含有する
 脳機能低下の予防または改善剤。

【請求項 3】

脳機能低下が、知覚能力低下、記憶学習能力低下、思考能力低下、集中力低下、注意力
 低下、判断能力低下、うつ症状、及びこれらに起因する運動パフォーマンス低下からなる
 群から選ばれる 1 以上の脳機能低下である請求項 2 に記載の脳機能低下の予防または改善
 剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、シトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩を有効成分とし
 て含有する脳機能低下の予防または改善剤に関する。

【背景技術】

【0002】

脳は運動・知覚など神経を介する情報伝達の最上位中枢であり、感情・情緒・理性など

ヒトの精神活動においても重要な役割を果たしている。脳外傷、脳血管障害、脳炎、低酸素症などを原因として生じる高次脳機能障害は、記憶障害、注意障害、遂行機能障害、社会的行動障害など多岐に渡り、脳の損傷部位によって特徴が分かれる。また、疲労によっても脳機能が低下する可能性が報告されており（非特許文献1）、記憶学習能力、注意集中力、判断能力などの低下につながることが考えられる。

【0003】

シトルリンは、生体内でタンパク質の合成原料としては使われず、遊離の状態で存在するアミノ酸の一種である。体内ではアルギニン前駆体としてアルギニン生合成や、一酸化窒素（NO）の供給に関わるNOサイクルの構成因子として重要な役割を果たしている。摂取したシトルリンは、大部分が腎臓でアルギニンに変換され、全身に効率良くアルギニンが供給されることが知られている（非特許文献2）。

10

【0004】

アルギニンは、一酸化窒素（NO）合成酵素の直接的な基質となるアミノ酸である。また、肝臓においては尿素回路の中間体でもあり、体内で産生したアンモニアを解毒するのに重要な役割を担っている。アルギニンを基質に合成されるNOは、血管弛緩作用、酸化LDL抑制作用、血小板凝集抑制作用、抗平滑筋細胞増殖作用、抗酸化作用など、正常な血管機能を維持するための多様な生理活性を発揮する。

【0005】

シトルリンの摂取により、血管拡張因子であるNO産生を介した抗動脈硬化作用および血流改善効果が報告されており（非特許文献3）、シトルリンは、NOを産生させ血流を改善する食品素材として米国を中心に用いられている。また、シトルリンは欧州では、抗疲労用の医薬品として、シトルリン-リンゴ酸塩の形態で用いられている。

20

【0006】

グルタチオンは、グルタミン酸、システイン、グリシンから成るトリペプチドであり、生体内における活性酸素種の除去機構において中心的役割を果たしている。さらに生体内異物を体外に除去する解毒機構にも関与する。

【0007】

グルタチオンの摂取により肝保護作用（非特許文献4）、美白作用（非特許文献5）などが報告されている。このような機能性から、グルタチオンは中毒時の解毒剤や肝機能改善用途の医薬品、または抗酸化用途の食品素材として使われている。

30

【0008】

虚血性の脳血管疾患は、脳神経細胞死を招き、脳機能を低下させることが知られている。この要因として、神経血管機能不全、内皮細胞変性、脳血流低下などが挙げられ（非特許文献6）、血管内皮細胞での正常なNO産生の低下および脳血流の低下が脳神経細胞死および脳機能低下を招いていることが考えられる。すなわち、血管内皮細胞でのNO産生の増強および脳血流を促進することにより、脳神経細胞を保護すること、および脳機能の低下を予防または改善することが期待できる。

【0009】

これまでに、シトルリン経口摂取による注意集中力向上（特許文献1）、アルギニンの腹腔内投与による記憶学習能力改善（非特許文献7）が報告されている。また、グルタチオンが脳機能の恒常性の維持に関与していること（非特許文献8）、およびグルタチオン点滴投与による脳組織代謝保護（非特許文献9）が報告されている。しかしながら、グルタチオン経口摂取による脳機能低下の予防または改善効果は知られておらず、シトルリンまたはその塩にグルタチオンおよびその塩を組み合わせることにより、相乗的な脳機能低下の予防または改善効果が得られることは知られていない。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】国際公開第2009/096505号

【非特許文献】

50

【0011】

【非特許文献1】「産業衛生学雑誌 (Journal of occupational health)」、2007年、第49巻、p. 203 - 208

【非特許文献2】「アミノアシツズ (Amino Acids)」2005年、第29巻、p. 177 - 205

【非特許文献3】「ピーエヌエーエス (PNAS)」2005年、第102巻、p. 13681 - 13686

【非特許文献4】「ジャーナルオブニュートリショナルサイエンスアンドバイタミノロジー (Journal of Nutritional Science & VitaminoLOGY)」1998年、第44巻、p. 613 - 624

【非特許文献5】「ジャーナルオブダーマトログカルトリートメント (Journal of Dermatological Treatment)」2012年、第23巻、第2号、p. 97 - 102

【非特許文献6】「ニューロサイエンス (Neuroscience)」1999年、91巻、p. 203 - 210

【非特許文献7】「サイコファーマコロジー (Psychopharmacology)」2003年、第167巻、p. 291 - 296

【非特許文献8】「インターナショナルジャーナルオブセルバイオロジー (International Journal of Cell Biology)」2012年、2012巻、Article ID 434971

【非特許文献9】「麻酔」1982年、第31巻、第4号、p. 313 - 327

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明の目的は、知覚能力低下、記憶学習能力低下、思考能力低下、集中力低下、注意力低下、判断能力低下、うつ症状、及びこれらに起因する運動パフォーマンス低下などの脳機能低下の予防または改善剤を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、下記の(1)～(13)に関する

(1) シトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩を有効成分として含有する脳神経細胞保護剤。

(2) シトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩を有効成分として含有する脳機能低下の予防または改善剤。

(3) 脳機能低下が、知覚能力低下、記憶学習能力低下、思考能力低下、集中力低下、注意力低下、判断能力低下、うつ症状、およびこれらに起因する運動パフォーマンス低下からなる群から選ばれる1以上の脳機能低下である(2)記載の脳機能低下の予防または改善剤。

(4) シトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩を有効成分として経口的に摂取させることを特徴とする、脳機能低下の予防または改善方法。

(5) シトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩を有効成分として含有する経口剤を摂取させることを特徴とする、脳機能低下の予防または改善方法。

(6) シトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩を有効成分として経口的に摂取させることを特徴とする、脳機能低下の予防または改善方法、ただし該予防または改善方法は医師によるヒトに対する手術方法、治療方法または診断方法を含まない。

(7) シトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩を有効成分として含有する経口剤を摂取させることを特徴とする、脳機能低下の予防または改善方法、ただし該予防または改善方法は医師によるヒトに対する手術方法、治療方法または診断方法を含まない。

(8) 脳神経細胞保護に使用するためのシトルリンまたはその塩、およびグルタチオンま

10

20

30

40

50

たはその塩。

(9) 脳機能低下の予防または改善に使用するためのシトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩。

(1 0) 脳機能低下が、知覚能力低下、記憶学習能力低下、思考能力低下、集中力低下、注意力低下、判断能力低下、うつ症状、及びこれらに起因する運動パフォーマンス低下からなる群から選ばれる 1 以上の脳機能低下である (9) 記載のシトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩。

(1 1) 脳神経細胞保護剤の製造のためのシトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩の使用。

(1 2) 脳機能低下の予防または改善剤の製造のためのシトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩の使用。

(1 3) 脳機能低下が、知覚能力低下、記憶学習能力低下、思考能力低下、集中力低下、注意力低下、判断能力低下、うつ症状、及びこれらに起因する運動パフォーマンス低下からなる群から選ばれる 1 以上の脳機能低下である (1 2) に記載の使用。

【発明の効果】

【 0 0 1 4 】

本発明により、シトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩を有効成分として含有する、安全で効果的な、脳神経細胞の保護剤、および脳機能低下の予防または改善剤を提供することができる。本発明の剤により、シトルリンまたはその塩とグルタチオンまたはその塩を併用することにより、相乗的かつ効果的に記憶行動を改善することができ、優れた脳機能低下の予防または改善剤を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 5 】

【図 1】図 1 は、マウスに各濃度の試料を 7 日間投与した後の Y 字迷路試験における自発的交替行動割合 (A l t e r n a t i o n) を示したものである。平均 ± 標準誤差、N = 5 ~ 7。異なる記号間では有意差があることを示す。

【図 2】図 2 は、マウスに各濃度の試料を 7 日間投与した後の受動的回避試験における明室に留まった時間 (L a t e n c y t i m e) を示したものである。平均 ± 標準誤差、N = 5 ~ 7。異なる記号間では有意差 ($p < 0.05$) があることを示す。

【図 3】図 3 は、マウスに各濃度の試料を 7 日間投与した後の新規物体認識試験における既存物体と新規物体の探索回数の割合を示したものである。平均 ± 標準誤差、N = 5 ~ 7。は、既存物体と新規物体とで有意差 ($p < 0.01$) があることを示す。

【図 4】図 4 は、マウスに各濃度の試料を 12 日間投与した後の海馬中の神経細胞生存率を示したものである。平均 ± 標準誤差、N = 4。異なる記号間では有意差 ($p < 0.05$) があることを示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 6 】

本発明で用いられるシトルリンとしては、L - シトルリンおよび D - シトルリンがあげられるが、L - シトルリンが好ましい。シトルリンは、化学的に合成する方法、発酵生産する方法等により取得することができる。また、シトルリンは、市販品を購入することにより取得することもできる。シトルリンを化学的に合成する方法としては、例えば、J . B i o l . C h e m . , 1 2 2 , 4 7 7 (1 9 3 8) 、 J . O r g . C h e m . , 6 , 4 1 0 (1 9 4 1) に記載の方法があげられる。

【 0 0 1 7 】

L - シトルリンを発酵生産する方法としては、例えば、特開昭 53 - 075387 号公報、特開昭 63 - 068091 号公報に記載の方法があげられる。また、L - シトルリンおよび D - シトルリンは、シグマ - アルドリッチ社等より購入することもできる。

【 0 0 1 8 】

シトルリンの塩としては、酸付加塩、金属塩、アンモニウム塩、有機アミン付加塩、アミノ酸付加塩等があげられる。酸付加塩としては、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩等

10

20

30

40

50

の無機酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、クエン酸塩、リンゴ酸塩、乳酸塩、 α -ケトグルタル酸塩、グルコン酸塩、カプリル酸塩等の有機酸塩があげられる。

【0019】

金属塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、亜鉛塩等があげられる。

アンモニウム塩としては、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム等の塩があげられる。

【0020】

有機アミン付加塩としては、モルホリン、ピペリジン等の塩があげられる。

【0021】

アミノ酸付加塩としては、グリシン、フェニルアラニン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸等の塩があげられる。上記のシトルリンの塩のうち、リンゴ酸塩が好ましく用いられるが、他の塩、または2以上の塩を適宜組み合わせ用いてもよい。

【0022】

本発明において用いられるグルタチオンとしては、還元型グルタチオンまたは酸化型グルタチオンがあげられる。

【0023】

還元型グルタチオンとは γ -L-Glu-L-Cys-Gly の構造を有するトリペプチドを表し、酸化型グルタチオンとは還元型グルタチオン2分子がS-S結合により結合したグルタチオンジペプチドを表す。

【0024】

本発明で用いられる還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオンは、どのような製造法によって得られたものであってもよい。還元型グルタチオンの製造法としては、酵母等の微生物からの抽出法 [Methods in Enzymology, 3, 603 (1957)]、化学合成法 [Bull. Chem. Soc. Jpn., 53, 2529 (1980)]、酵素法 (特開昭61-74595号公報) 等の方法が、酸化型グルタチオンの製造法としては、[Acta Biochim. Pol., 17, 175 (1970)] 等の方法があげられる。また、還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオンは、シグマ-アルドリッチ社等より購入することもできる。

【0025】

本発明の脳機能低下の予防または改善剤は、還元型グルタチオンまたは酸化型グルタチオンのいずれかを単独で含有してもよいし、還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオンを同時に含有してもよい。

【0026】

また、本発明の脳機能低下の予防または改善剤に含まれる還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオンは、それらの塩として該剤中に存在してもよい。還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオンの塩としては、上記のシトルリンの塩と同様のものがあげられる。

【0027】

また、本発明では、生体内で還元型グルタチオンに代謝される物質、例えば、N-アセチルシステイン等をグルタチオンの代りに使用することもできる。

【0028】

本発明の脳機能低下の予防または改善剤中の、シトルリンまたはその塩とグルタチオンまたはその塩との組成比は、質量比で1:100~100:1、好ましくは1:50~50:1、とりわけ好ましくは10:1~1:10である。

【0029】

本発明の脳機能低下の予防または改善剤としては、シトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩をそのまま投与することも可能であるが、通常各種の製剤として提供するのが望ましい。

【0030】

製剤は、有効成分としてシトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩を含有するが、更に任意の有効成分を含有していてもよい。また、それら製剤は、有効成分を薬理学的に許容される一種またはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られている任意の方法により製造される。

【 0 0 3 1 】

製剤の投与形態は、経口投与または、例えば静脈内、腹膜内もしくは皮下投与等の非経口投与をあげることができるが、経口投与が好ましい。

【 0 0 3 2 】

投与する剤形としては、例えば錠剤、散剤、顆粒剤、丸剤、懸濁剤、乳剤、浸剤・煎剤、カプセル剤、シロップ剤、液剤、エリキシル剤、エキス剤、チンキ剤、流エキス剤等の経口剤、注射剤、点滴剤、クリーム剤、坐剤等の非経口剤のいずれでもよいが、経口剤として好適に用いられる。

10

【 0 0 3 3 】

経口投与に適当な、例えばシロップ剤のような液体調製物は、水、蔗糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p - ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、パラオキシ安息香酸メチル等のパラオキシ安息香酸誘導体、安息香酸ナトリウム等の保存剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類などを添加して製剤化することができる。

【 0 0 3 4 】

20

また、経口投与に適当な、例えば錠剤、散剤および顆粒剤等は、乳糖、白糖、ブドウ糖、蔗糖、マンニトール、ソルビトール等の糖類、バレイショ、コムギ、トウモロコシ等の澱粉、炭酸カルシウム、硫酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム等の無機物、結晶セルロース、カンゾウ末、ゲンチアナ末等の植物末等の賦形剤、澱粉、寒天、ゼラチン末、結晶セルロース、カルメロースナトリウム、カルメロースカルシウム、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク、水素添加植物油、マクロゴール、シリコーン油等の滑沢剤、ポリビニールアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、カルメロース、ゼラチン、澱粉のり液等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤などを添加して製剤化することができる。

30

【 0 0 3 5 】

また、経口摂取または投与に適当な製剤には、一般に飲食品に用いられる添加剤、例えば甘味料、着色料、保存料、増粘安定剤、酸化防止剤、発色剤、漂白剤、防かび剤、ガムベース、苦味料、酵素、光沢剤、酸味料、調味料、乳化剤、強化剤、製造用剤、香料、香辛料抽出物等が添加されてもよい。

【 0 0 3 6 】

また、経口摂取または投与に適当な製品形態または製剤は、例えば摂取期間、摂取回数、摂取量など摂取当たりの単位包装形態の錠剤、散剤、顆粒剤、丸剤、懸濁剤、乳剤、浸剤・煎剤、カプセル剤、ドリンク剤、液剤、エリキシル剤、エキス剤、チンキ剤、流エキス剤に加工製造することができる。例えば「1回摂取当たりの単位包装形態」とは、1回当たりに摂取する量が予め定められた形態であり、「1週間～3ヶ月間当たりの単位包装形態」とは、1週間～3ヶ月間で摂取する量が含まれている形態である。単位包装形態としては、例えば、パック、包装、ボトル等で一定量を規定する形態が挙げられる。

40

【 0 0 3 7 】

例えば「1回摂取当たりの単位包装形態」としては、製品形態または製剤がドリンク剤であるような場合50mg以上のシトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩が懸濁あるいは溶解したドリンクが1回摂取あたり飲み切りの形態でビン等に入れている形態が挙げられる。

【 0 0 3 8 】

例えば「1週間～3ヶ月間当たりの単位包装形態」としては、1日1回摂取で、1日摂

50

取量が300mgであり、シトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩を50mg含む錠剤の場合、42～540錠が包装された形態などが挙げられる。

【0039】

非経口投与に適切な、例えば注射剤は、好ましくは受容者の血液と等張であるシトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩を含む滅菌水性剤からなる。例えば、注射剤の場合は、塩溶液、ブドウ糖溶液または塩溶液とブドウ糖溶液の混合物からなる担体等を用いて注射用の溶液を調製する。

【0040】

また、これら非経口剤においても、経口剤で例示した防腐剤、保存剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、界面活性剤、可塑剤などから選択される1種またはそれ以上の補助成分を添加することができる。

10

【0041】

本発明の脳機能低下の予防または改善剤中のシトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩の濃度は、製剤の種類、該製剤の投与により期待する効果等に応じて適宜選択される。シトルリンまたはその塩として、通常は0.1～90質量%、好ましくは0.5～70質量%、特に好ましくは1～50質量%である。グルタチオンまたはその塩として、通常は0.1～90質量%、好ましくは0.5～70質量%、特に好ましくは1～50質量%である。

【0042】

本発明の脳機能低下の予防または改善剤中の投与量および投与回数は、投与形態、患者の年齢、体重、治療すべき症状の性質もしくは重篤度により異なる。通常、成人一日当り、シトルリンまたはその塩として、通常は50mg～30g、好ましくは100mg～10g、特に好ましくは200mg～3gとなるように一日一回ないし数回投与する。また通常、成人一日当り、グルタチオンまたはその塩として、通常は50mg～30g、好ましくは100mg～10g、特に好ましくは200mg～3gとなるように、一日一回ないし数回投与する。

20

【0043】

摂取または投与期間は、特に限定されないが、通常は1日間～1年間、好ましくは1週間～3ヶ月間である。

【0044】

本発明の脳機能低下の予防または改善剤は、脳神経細胞を保護するために使用することができる。本発明の脳機能低下の予防または改善剤は、脳神経細胞死から進展する脳機能低下の予防または改善に使用することができる。機能低下の予防または改善から期待される効果として、例えば、知覚能力低下、記憶学習能力低下、思考能力低下、集中力低下、注意力低下、判断能力低下、うつ症状、認知機能低下、およびこれらに起因する運動パフォーマンス低下の予防または改善に使用することができる。

30

【0045】

よって、それらの症状の発生を予防したい者または該症状を呈する者に本発明の脳機能低下の予防または改善剤を投与することにより、該症状を予防または改善することができる。

40

【0046】

さらに本発明においては、脳機能低下の予防または改善剤を製造するために、シトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩を使用され得る。

【0047】

さらにまた本発明は、脳神経細胞を保護するための方法を包含する。本発明の方法は、脳神経細胞を保護する必要がある被験体に、該被験体の脳神経細胞を保護するのに十分な量のシトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩を摂取させる、または投与する工程を含む。

【0048】

さらにまた本発明は、脳機能低下の予防または改善方法を包含する。本発明の方法は、

50

脳機能低下の予防または改善させる必要のある対象者に、該対象者の脳機能低下の予防または改善に十分な量のシトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩を摂取させる、または投与する工程を含む。

【実施例】

【0049】

以下に、シトルリン、およびグルタチオンの脳機能の予防もしくは改善に関する試験例を示す。

【0050】

試験例

10週齢雄性C57BL/6Jマウス（日本クレア株式会社、一匹当たり平均体重約25g程度）を1週間の予備飼育した後、実験に供した。シトルリンおよびグルタチオンは協和発酵バイオ株式会社製を用いた。

【0051】

C57BL/6Jマウスを偽手術群（第1群）、2血管閉塞群に分け、2血管閉塞群のマウスの両総頸動脈をハロタン麻酔下で20分間閉塞した。再灌流後1日目に、2血管閉塞群をさらに蒸留水投与群（第2群）、低用量シトルリン投与群（40mg/kg：第3群）、低用量グルタチオン投与群（40mg/kg：第4群）、高用量シトルリン投与群（100mg/kg：第5群）、高用量グルタチオン投与群（100mg/kg：第6群）、低用量シトルリンと低用量グルタチオンの併用投与群（各40mg/kg：第7群）に群分けし、12日間、各試料を経口投与した。投与開始から1週間後にY字迷路試験、受動的回避試験、新規物体認識試験により、学習記憶改善効果を検討した。学習記憶機能評価後に海馬を摘出し、海馬中の神経細胞生存率を評価した。

【0052】

Y字迷路試験

Y字迷路試験には3本のアーム（50×16×32cm）で接続されたY字型迷路装置を用いた。マウスをY字迷路のいずれかのアームの先端に置き、8分間、迷路内を自由に探索させ、マウスが移動したアームを順に記録した。マウスが測定時間内に各アームに移動した回数を計数し、これを総進入数とした。この内、連続して異なる三つのアームを選択した組み合わせを調べ、この数を自発的交替行動数とした。自発的交替行動数を総進入数から2を引いた数で割り、それに100を掛けて求めた値を自発的交替行動変化率（Alternation）とし、これを自発的交替行動の指標とした。

【0053】

図1に示すように、第1群と比較して第2群で有意な自発的交替行動変化率の低値を示した。単独で自発的交替行動変化率を改善しない濃度範囲の第3群と第4群の試料を併用した第7群においては、自発的交替行動変化率が第2群と比較して有意に高値を示し、第5群および第6群と同等の顕著な記憶行動改善効果が認められた。

【0054】

受動的回避試験

受動的回避試験は暗室（25×25×25cm）と明室（14×10×25cm）で構成され、暗室の床に電気刺激装置を設置した箱を用いて実施した。訓練施行では、マウスが明室から暗室に移動した際、扉を閉め、電気刺激（0.3mA、2秒間）を与えた。訓練施行から24時間後、マウスを再び明室に入れ、明室に留まった時間（Latency time）を計測した。明室に留まる時間の測定は最大300秒とした。

【0055】

図2に示すように、第1群と比較して第2群で有意な明室に留まった時間の低値を示した。単独で明室に留まった時間を改善しない濃度範囲の第3群と第4群の試料を併用した第7群においては、明室に留まった時間が第2群と比較して有意に高値を示し、第5群および第6群と同等の顕著な記憶行動改善効果が認められた。

【0056】

新規物体認識試験

10

20

30

40

50

新規物体認識試験はオープンフィールド装置(35×25×35cm)にマウスを個別に2日間馴化させた後、実施した。訓練施行では、二つの同一物体を対称に置いた装置内で、マウスを10分間自由に探索させた。1時間後に片一方の物体を新規物体に置き換え、再び5分間自由に探索させた。探索行動は、マウスが物体の上に立つこと、鼻が物体に触れること、もしくは物体から1cm以内で臭いを嗅ぐことと定義した。総探索回数に対する既存物体と新規物体の探索回数の割合を算出し、視覚的認知記憶の指標とした。

【0057】

図3に示すように、第1群でみられた新規物体の探索回数の増加が、第2群では認められなかった。単独で新規物体の探索回数の増加が認められない濃度範囲の第3群と第4群の試料を併用した第7群においては、新規物体の探索回数が有意に増加し、第5群および第6群と同等の顕著な記憶行動改善効果が認められた。

10

【0058】

海馬中の神経細胞生存率評価

両総頸動脈閉塞処置から12日後、マウスをペントバルビタールナトリウムにより麻酔をかけ、体内の血液がなくなるまで氷冷のリン酸緩衝液(PBS, pH7.4)で灌流した。その後、直ちに4%パラホルムアルデヒドを含んだ固定液で灌流した。脳組織を4で24時間固定し、50μmの厚さで冠状切片を作製した。海馬領域を含む連続切片をPBSに溶解したヨウ化プロピジウム(PI, 5μmol/L)を用いて染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。海馬CA1領域の錐状体細胞層の生存神経細胞と非生存神経細胞をプレグマの後方1.4~1.8mmの区分から計数し、PIにより核が染色され、通常の形態特性を持った細胞を生存神経細胞と定義した。細胞生存率は第1群の生存神経細胞の平均数の割合から算出した。

20

【0059】

図4に示すように、第1群と比較して第2群で海馬中の神経細胞生存率の有意な減少が認められた。単独で海馬中の神経細胞生存率を改善しない濃度範囲の第3群と第4群の試料を併用した第7群においては、海馬中の神経細胞生存率が第2群と比較して有意に高値を示し、第5群および第6群と同等の神経細胞保護効果が認められた。

【0060】

これらのことから、シトルリンとグルタチオンを併用することにより、相乗的かつ効果的に記憶行動を改善することが明らかとなり、本発明の剤は優れた脳機能低下の予防または改善剤であることが示された。

30

【0061】

以下に、本発明の実施例を示す。

【0062】

[実施例1]

シトルリンおよびグルタチオンを含有する錠剤の製造

L-シトルリン120kg、還元型グルタチオン120kg、環状オリゴ糖19kg、セルロース57kgおよびプルラン1kgを流動層造粒乾燥機で造粒した。得られた造粒物とステアリン酸カルシウム3kgとをコニカルブレンダーで混合した後、ロータリー圧縮成形機で圧縮成形して錠剤を製造する。

40

【0063】

[実施例2]

シトルリンおよびグルタチオンを含有する腸溶錠剤の製造

実施例1で製造する錠剤の表面をシェラック溶液でコーティングして腸溶錠剤を製造する。

【0064】

[実施例3]

シトルリンおよびグルタチオンを含有する腸溶カプセルの製造

L-シトルリン120kg、還元型グルタチオン120kg、環状オリゴ糖19kg、セルロース57kg、ステアリン酸カルシウム3kgおよびプルラン1kgを、コニカル

50

ブレンダーで混合する。得られる混合物 20 kg と 0.2 kg の二酸化ケイ素とを混合攪拌して得られた混合物をカプセル充填機に投入、ハードカプセルに充填してハードカプセルを得る。得られるハードカプセルの表面をツェイン溶液でコーティングして腸溶カプセルを製造する。

【0065】

[実施例4]

シトルリンおよびグルタチオンを含有する飲料の製造(1)

L-シトルリン 1.28 kg、酸化型グルタチオン 1.28 kg、エリスリトール 3 kg、クエン酸 0.05 kg、人工甘味料 3 g、香料 0.06 kg を液温 70 で水 50 L に攪拌溶解し、クエン酸で pH を 3.3 に調整後、プレート殺菌を用いて滅菌して瓶に充填後、パストライザー殺菌し、飲料を製造する。

10

【0066】

[実施例5]

シトルリンおよびグルタチオンを含有する飲料の製造(2)

L-シトルリン 20 mg、酸化型グルタチオン 20 mg、L-アルギニン 20 mg と適当量の果糖ぶどう糖液糖、食塩、クエン酸、香料、クエン酸 Na、乳酸 Ca、ピロリン酸鉄、グルコン酸 Ca、塩化 K、塩化 Mg、甘味料とを配合し 555 ml の飲料を製造する。

【0067】

[実施例6]

シトルリンおよびグルタチオンを含有する飲料の製造(3)

L-シトルリン 100 mg、酸化型グルタチオン 100 mg、L-アルギニン 100 mg、L-アラニン 2.5 mg、L-グリシン 2.5 mg、L-ロイシン 2.5 mg、L-イソロイシン 1.3 mg、L-バリン 1.3 mg と適当量の香料、甘味料を配合し 300 ml の飲料を製造する。

20

【0068】

本出願は、2012年10月30日付で出願された日本特許出願(特願2012-238541)に基づいており、その全体が引用により援用される。

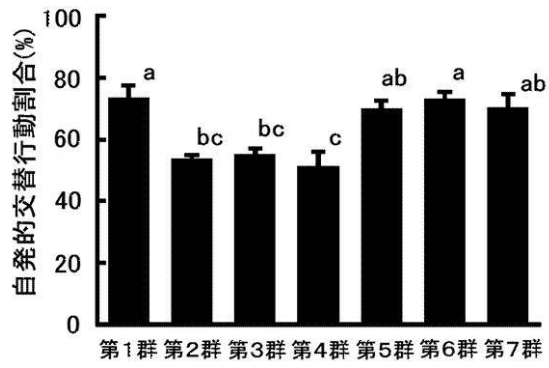
【産業上の利用可能性】

【0069】

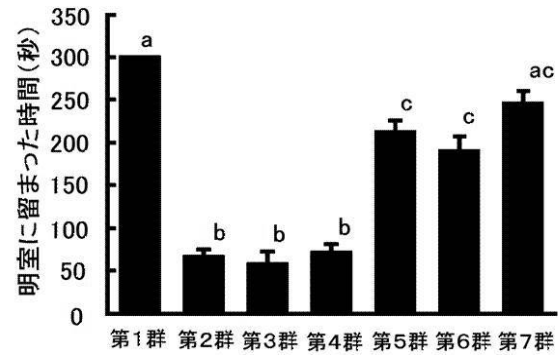
本発明により、シトルリンまたはその塩、およびグルタチオンまたはその塩を有効成分として含有する、知覚能力低下、記憶学習能力低下、思考能力低下、集中力低下、注意力低下、判断能力低下、うつ症状、及びこれらに起因する運動パフォーマンス低下などの脳機能低下の予防または改善剤が提供される。本発明の剤により、シトルリンまたはその塩とグルタチオンまたはその塩を併用することにより、相乗的かつ効果的に記憶行動を改善することができ、優れた脳機能低下の予防または改善剤を提供することができる。

30

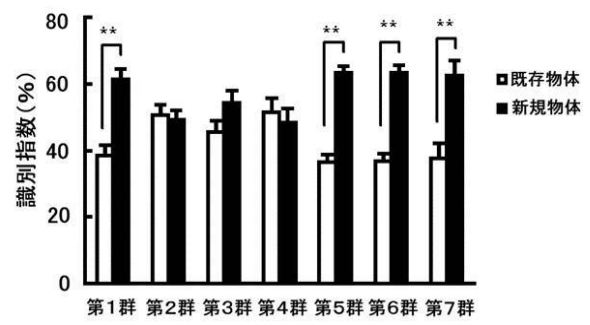
【図1】



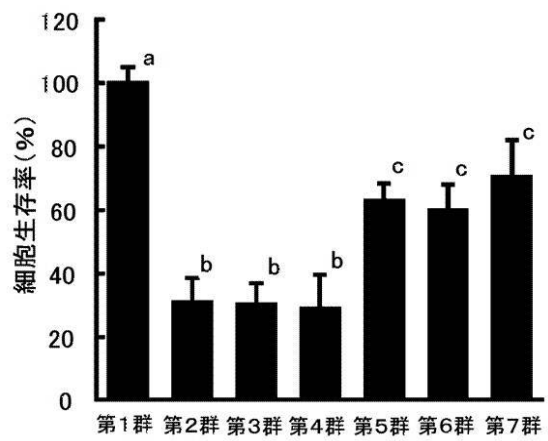
【図2】



【図3】



【図4】



 フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 P 25/02 (2006.01) A 6 1 P 25/02
 A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 0 5

(72)発明者 原 孝博
 茨城県つくば市御幸が丘2 協和発酵バイオ株式会社 ヘルスケア商品開発センター内
 (72)発明者 福永 浩司
 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6 - 3 東北大学大学院薬学研究科 薬理学分野

審査官 砂原 一公

(56)参考文献 国際公開第2009/096505(WO, A1)
 特開2010-126462(JP, A)
 Synergy effects of glutathione and amino acids on the antioxidant efficieny of vitamin e C and E in the induced oxidation of methyl linolenate, ROUSSEAU, Claire et al., Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique, 1988年, Vol.85, No.1, p.145-146

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 A 6 1 K 3 8 / 0 0
 A 6 1 K 3 1 / 1 9 8
 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)
 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)