



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107405366 B

(45) 授权公告日 2022.07.22

(21) 申请号 201680016841.9

A61P 25/28 (2006.01)

(22) 申请日 2016.07.14

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107405366 A

CN 102724986 A, 2012.10.10  
WO 2006082609 A1, 2006.08.10  
CN 103702661 A, 2014.04.02  
CN 103550537 A, 2014.02.05

(43) 申请公布日 2017.11.28

CN 1753675 A, 2006.03.29  
CN 104288396 A, 2015.01.21  
CN 104547388 A, 2015.04.29

(30) 优先权数据  
2015-144319 2015.07.21 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2017.09.19

Nobuyoshi Nakajima等. Earthworm-serine protease: characterization, molecular cloning, and application of the catalytic functions. 《JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B-ENZYMATIC》. 2003, 第23卷 (第2-6期), Nobuyoshi NAKAJIMA等. Further Characterization of Earthworm Serine Proteases: Cleavage Specificity Against Peptide Substrates and on Autolysis. 《Biosci Biotechnol Biochem》. 1999, 第63卷 (第11期), (续)

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/JP2016/070902 2016.07.14

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02017/014162 JA 2017.01.26

(73) 专利权人 井石有限会社  
地址 日本宫崎县

审查员 张珍珍

(72) 发明人 石井阳一 冈本猛 石井纱也香

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所 (普通合伙) 11277  
专利代理师 刘新宇 李茂家

(51) Int. Cl.

A61K 35/62 (2006.01)  
A23L 33/10 (2006.01)  
A61P 3/00 (2006.01)

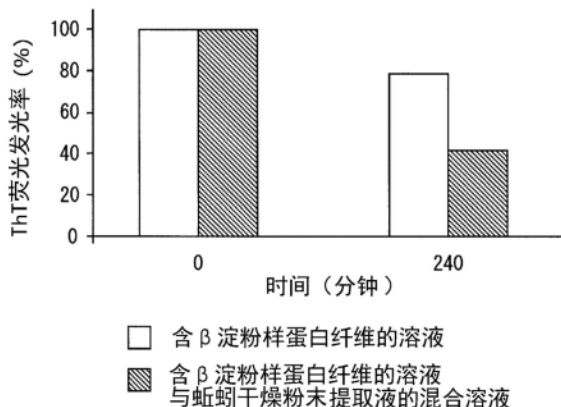
权利要求书1页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

β 淀粉样蛋白纤维分解剂、由 β 淀粉样蛋白的纤维化引起的疾病的治疗药/预防药

(57) 摘要

本发明在于提供含有天然物作为有效成分的 β 淀粉样蛋白纤维分解剂、由 β 淀粉样蛋白的纤维化引起的疾病的治疗药物或预防药物。其为含有蚯蚓的干燥粉末、磨碎物和/或提取物作为有效成分的、β 淀粉样蛋白纤维分解剂、由 β 淀粉样蛋白的纤维化引起的疾病的治疗药或预防药。由 β 淀粉样蛋白的纤维化引起的疾病优选为阿尔茨海默氏病。



CN 107405366 B

[接上页]

(56) 对比文件

Dae HongKim等.Neurotropic and neuroprotective activities of the

earthworm peptide Lumbricusin.

《Biochemical and Biophysical Research Communications》.2014,第448卷(第3期),

1. 通过以下制造方法得到的蚯蚓的干燥粉末、磨碎物和/或提取物在制备β淀粉样蛋白纤维分解剂中的应用, 其特征在于,

所述制造方法具备以下工序: 使活蚯蚓与选自钾、钠、镁和钙组成的组中的至少1种金属的氯化物接触,

其后, 使粉末状羟基羧酸与活蚯蚓接触, 用水稀释而调节至pH2~5, 保持3~180分钟后; 或者, 将活蚯蚓浸渍在调节至pH2~5的羟基羧酸水溶液中, 保持3~180分钟后,

将活蚯蚓水洗、磨碎, 将得到的磨碎物冷冻干燥而成的物质溶解于水或乙醇水溶液, 去除或分离不溶性组分。

2. 一种分解β淀粉样蛋白纤维的方法, 其特征在于, 其为使用蚯蚓的干燥粉末、磨碎物和/或提取物分解β淀粉样蛋白纤维的方法,

所述分解方法具备以下工序: 使活蚯蚓与选自钾、钠、镁和钙组成的组中的至少1种金属的氯化物接触,

其后, 使粉末状羟基羧酸与活蚯蚓接触, 用水稀释而调节至pH2~5, 保持3~180分钟后; 或者, 将活蚯蚓浸渍在调节至pH2~5的羟基羧酸水溶液中, 保持3~180分钟后,

将活蚯蚓水洗、磨碎, 将得到的磨碎物冷冻干燥而成的物质溶解于水或乙醇水溶液, 去除或分离不溶性组分。

## β淀粉样蛋白纤维分解剂、由β淀粉样蛋白的纤维化引起的疾病的治疗药/预防药

### 技术领域

[0001] 本发明涉及β淀粉样蛋白纤维分解剂、由β淀粉样蛋白的纤维化引起的疾病的治疗药/预防药。

### 背景技术

[0002] 已知β淀粉样蛋白(也称淀粉样蛋白β蛋白或淀粉样蛋白β肽)为包含约40个残基的氨基酸的蛋白质,在阿尔茨海默氏病患者脑内,β淀粉样蛋白聚集而蓄积纤维化的β淀粉样蛋白纤维。β淀粉样蛋白为向细胞外释放的水溶性蛋白质,其自身对神经细胞不显示毒性,通过形成β淀粉样蛋白纤维才对神经细胞产生毒性(例如专利文献1),因此认为β淀粉样蛋白纤维的蓄积是引起阿尔茨海默氏病的原因之一。

[0003] 已知作为β淀粉样蛋白的主要分子种类为由40个残基形成的C末端为Val的β淀粉样蛋白40和由42个残基形成的C末端为Ala的β淀粉样蛋白42,在通常的神经细胞中,β淀粉样蛋白40比β淀粉样蛋白42多产生近10倍(非专利文献1)。已知β淀粉样蛋白42聚集性高,在阿尔茨海默氏病患者的脑中也从初期开始优势地蓄积。另外,作为与家族性阿尔茨海默氏病关联的基因突变,已知β淀粉样蛋白的前体蛋白质(APP)中存在的Iranian突变(T714A)等突变对β淀粉样蛋白的总产生量没有很大影响而使聚集性高的β淀粉样蛋白42的产生比率上升。另外,作为这样的基因突变,还已知使β淀粉样蛋白的总产生量增加的突变、提高β淀粉样蛋白的聚集性的基因突变。

[0004] 以往,进行了以β淀粉样蛋白作为靶的阿尔茨海默氏病的治疗药的开发。例如专利文献2中记载了含有长春西汀及其衍生物的淀粉样蛋白β蛋白产生/分泌抑制剂。另外,专利文献3中记载了能阻碍淀粉样蛋白β肽的纤维化的肽。

[0005] 另一方面,蚯蚓提取物、蚯蚓干燥粉末自古主要在东方各国中用作各种疾病的预防剂、治疗剂,至今已知作为膀胱内结石缩小剂和排出促进剂、黄疸治疗剂、分娩促进剂、强壮剂、生发剂、催欲剂、退热剂、痉挛治疗剂、血液循环促进剂、半身不遂治疗剂、间接止痛剂、利尿剂、支气管哮喘剂、高血压症治疗剂的用途。

[0006] 但是,至今没有利用蚯蚓进行阿尔茨海默氏病的预防/治疗的报告例。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:日本专利4227245号公报

[0010] 专利文献2:日本特开平8-283157号公报

[0011] 专利文献3:日本专利5464383号公报

[0012] 非专利文献

[0013] 非专利文献1:Asami-Odaka,A et al.,Biochemistry:1995,34(32);10272-10278

[0014] 非专利文献2:Iwatsubo,T et al.,Neuron(1994),13(1);45-53)

## 发明内容

### [0015] 发明要解决的问题

[0016] 认为在阿尔茨海默氏病的预防、治疗中伴随长时间的药剂的给予,因此特别需要安全且副作用少的药剂,要求防止β淀粉样蛋白的纤维化的来自天然物的预防药/治疗药。

[0017] 因此本发明的目的在于提供含有天然物作为有效成分的β淀粉样蛋白纤维分解剂、由β淀粉样蛋白的纤维化引起的疾病的治疗药或预防药。

### [0018] 用于解决问题的方案

[0019] 即,本发明的β淀粉样蛋白纤维分解剂的特征在于含有蚯蚓的干燥粉末、磨碎物和/或提取物作为有效成分。

[0020] 由本发明的β淀粉样蛋白的纤维化引起的疾病的治疗药或预防药的特征在于含有前述β淀粉样蛋白纤维分解剂。

[0021] 对于由本发明的β淀粉样蛋白的纤维化引起的疾病的治疗药或预防药,其中,由前述β淀粉样蛋白的纤维化引起的疾病优选为阿尔茨海默氏病。

[0022] 本发明的β淀粉样蛋白纤维分解剂的制造方法的特征在于使用蚯蚓的干燥粉末、磨碎物和/或提取物。

[0023] 本发明的β淀粉样蛋白纤维分解剂的制造方法优选具备以下工序:使活蚯蚓与选自钾、钠、镁和钙组成的组中的至少1种金属的氯化物接触,其后,使粉末状羟基羧酸与活蚯蚓接触,用水稀释调节至pH2~5、保持3~180分钟后、将活蚯蚓水洗、磨碎,将得到的磨碎物冷冻干燥而成的物质溶解于水或乙醇水溶液,去除或分离不溶性组分。

[0024] 本发明的β淀粉样蛋白纤维分解剂的制造方法优选具备以下工序:使活蚯蚓与选自钾、钠、镁和钙组成的组中的至少1种金属的氯化物接触,其后,将活蚯蚓浸渍在调节至pH2~5的羟基羧酸水溶液中,保持3~180分钟后,将活蚯蚓水洗、磨碎,将得到的磨碎物冷冻干燥而成的物质溶解于水或乙醇水溶液,去除或分离不溶性组分。

[0025] 由本发明的β淀粉样蛋白的纤维化引起的疾病的治疗药或预防药的制造方法的特征在于使用蚯蚓的干燥粉末、磨碎物和/或提取物。

[0026] 本发明的β淀粉样蛋白纤维的分解方法的特征在于使用蚯蚓的干燥粉末、磨碎物和/或提取物。

[0027] 本发明的蚯蚓的干燥粉末、磨碎物或提取物用于由β淀粉样蛋白的纤维化引起的疾病的治疗。

[0028] 由本发明的β淀粉样蛋白的纤维化引起的疾病的治疗方法或预防方法的特征在于向对象给予有效量的蚯蚓的干燥粉末、磨碎物和/或提取物。

### [0029] 发明的效果

[0030] 根据本发明可以提供含有天然物作为有效成分的β淀粉样蛋白纤维分解剂、由β淀粉样蛋白的纤维化引起的疾病的治疗药或预防药。

## 附图说明

[0031] 图1为对含β淀粉样蛋白纤维的溶液、与含β淀粉样蛋白纤维的溶液和蚯蚓干燥粉末提取液的混合溶液的硫黄素T(以下ThT)荧光发光量进行比较而得到的图表。

## 具体实施方式

[0032] 本发明方法中,对原料使用的蚯蚓没有特别的限定,例如可以使用红蚯蚓(*Lumbricus rubellus*)、LT蚯蚓(*Lumbricus terrestris*)、赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)、缟蚯蚓(*Allolobophora caliginosa*)、八毛枝蚓(*Dendrobaena octaedra*)、樱蚯蚓(*Allolobophora japonica* Michaelsen)、八田蚯蚓(*Drawida hattamimizu* Hatai)、背黑蚯蚓(*Pheretima divergens* Michaelsen)、普通蚯蚓(*Pheretima communissima*)、田地蚯蚓(*Pheretima agrestis*)、西宝环毛蚓(*Pheretima sieboldi* Horst)、黑氏环毛蚓(*Pheretima hilgendorfi*)、湖滨蚯蚓(*Pontodrilus matsushimensis* Iizuka)、丝蚯蚓(*Tubifex hattai* Nomura)、后藤丝蚯蚓[*Limnodrilus gotoi* Hatai=L.*Socialis* Stephenson]等。

[0033] 本发明中,蚯蚓的干燥粉末是将未处理的或经前处理的蚯蚓的磨碎物或提取物干燥而得到的粉末。另外,蚯蚓的磨碎物是将未处理的或经前处理的蚯蚓磨碎而得到的液态或糊状物质。蚯蚓的提取物是将未处理的或经前处理的蚯蚓或其磨碎物溶解于水或有机溶剂,去除或分离不溶性组分而得到的提取物。对前述前处理没有特别的限定,可列举出后述污物等的去除处理等。另外,蚯蚓的干燥粉末、磨碎物和提取物还可以进行后处理,作为后处理可列举出造粒、过滤、纯化、浓缩、稀释和pH调节等。

[0034] 对用于得到蚯蚓的磨碎物的磨碎方法没有特别的限定,例如可以使用均化器、混合器、均质混合器、擂溃机、加压型细胞破坏装置等进行磨碎。

[0035] 对用于得到蚯蚓的提取物(萃取物)的提取(萃取)方法没有特别的限定,例如可以将蚯蚓的干燥粉末或磨碎物溶解于提取溶剂,去除或分离不溶性组分来提取。作为提取溶剂,可列举出水、水溶液以及乙醇、丙酮和醋酸乙酯等有机溶剂,可以单独使用1种、或组合使用2种以上。其中优选为水、乙醇或乙醇水溶液。

[0036] 对用于得到蚯蚓的干燥物的干燥方法没有特别的限定,可以利用冷冻干燥、加热干燥和喷雾干燥等干燥方法进行干燥。其中,由于后述理由优选冷冻干燥。

[0037] 本发明中,蚯蚓的干燥粉末、磨碎物或提取物根据目的配混有效的量即可。合适的配混量取决于目的、给药途径和形态、蚯蚓的干燥粉末等的制造方法等各种因素,按照去除后述的残留在蚯蚓的消化管内的消化物、附着在表皮的污物等后,将蚯蚓磨碎,换算成将磨碎物冷冻干燥而得到的蚯蚓的干燥粉末的重量,以由 $\beta$ 淀粉样蛋白的纤维化引起的疾病的预防或轻度的疾病的治疗为目的,优选为每1天1~15000mg,更优选为每1天12~1800mg,进一步优选为每1天120~180mg。另外,以由 $\beta$ 淀粉样蛋白的纤维化引起的重度的疾病的治疗为目的,优选为每1天1~15000mg,更优选为每1天18~3600mg,进一步优选为每1天180~360mg。

[0038] 对本发明的 $\beta$ 淀粉样蛋白纤维分解剂、治疗药、预防药和食品组合物的形状没有特别的限定,可以为固体、粉末、半固体和液体的任意者均可。

[0039] 本发明中,蚯蚓的干燥粉末、磨碎物或提取物可以直接使用。另外,尤其在本发明的 $\beta$ 淀粉样蛋白纤维分解剂、治疗药和预防药中,可以包含药学上可以允许的载体,例如作为片剂、颗粒剂、散剂、胶囊剂、软胶囊剂、溶液剂、注射剂、栓剂、缓释剂等,可以经口或非经口(例如静脉给予、直接向患部给予等)地给予。作为药学上可以允许的载体,可以使用赋形剂、粘合剂、崩解剂、流化剂、润滑剂、包衣剂、悬浊剂、着色剂、甜味剂或表面活性剂等,按照

公知的方法可以制成通常的医药制剂的形态。另外,也可以包含其它治疗/预防成分、药学上可以允许的添加剂。

[0040] 另外,本发明尤其是本发明的 $\beta$ 淀粉样蛋白纤维分解剂和食品组合物中,可以包含食品中通常使用的添加剂。例如可以使用赋形剂、粘合剂、崩解剂、流化剂、润滑剂、包衣剂、悬浊剂、着色剂、甜味剂或表面活性剂等,按照公知的方法可以制成通常的食品组合物的形态。另外,可以包含其它食品或来自食品的成分。

[0041] 本发明中,蚯蚓的干燥粉末、磨碎物和提取物之中,从制造工序的保存稳定性的观点来看,优选使用蚯蚓的干燥粉末。也可以使蚯蚓的干燥粉末预先溶解和/或分散于水等液体后,与药学上和或食品上使用的通常的载体、添加剂等其它成分混合。

[0042] 本发明中,对由 $\beta$ 淀粉样蛋白的纤维化引起的疾病没有特别的限定,除了阿尔茨海默氏病之外,可列举出唐氏综合症。

[0043] 为了将蚯蚓作为原料用于经口给予,优选去除残留在蚯蚓的消化管内的消化物、附着在表皮的污物等。本发明中对去除方法没有特别的限定,可以使用公知的方法去除。例如可以使用:将蚯蚓生物体浸渍在钠盐或钾盐这样的碱盐水溶液中,使消化管内的黄土排泄的方法(日本特开平1-47718号公报、日本特开平1-47719号公报、日本特开平1-47720号公报和日本特开平1-268639号公报记载的方法),将蚯蚓生物体放置于维持在6~26°C的酸水溶液中放置0.1~5小时而去除消化管内的粪土的方法(日本特开平3-72427号公报记载的方法)等。

[0044] 本发明中,作为去除方法,优选使下述金属的氯化物和/或羟基羧酸与蚯蚓接触。

[0045] 上述金属的氯化物为选自钾、钠、镁和钙组成的组中的至少1种金属的氯化物。即选自氯化钾、氯化钠、氯化镁和氯化钙组成的组中的至少1种。另外,可以是它们的混合物,也可以是它们与可以添加于食品中的其它无害成分的混合物。作为这样的混合物,例如可列举出食盐、岩盐、晒盐。上述金属的氯化物可以通过将粉末状的物质撒在活蚯蚓上来使用,由此引起蚯蚓与金属的氯化物的接触。

[0046] 使上述金属的氯化物接触活蚯蚓后,使活蚯蚓与下述这样的羟基羧酸接触是优选的。另外,也可以不与上述金属的氯化物接触,如下所述进行羟基羧酸与蚯蚓的接触。

[0047] 对于与上述羟基羧酸的接触,可以通过将粉末状的羟基羧酸撒在活蚯蚓上来进行。另外,也可以浸渍在pH2~5的羟基羧酸水溶液中。在经过与金属的氯化物的接触后进行与羟基羧酸的接触时,与羟基羧酸的接触优选在与上述金属的氯化物的接触后迅速进行。另外,在使活蚯蚓与羟基羧酸接触前,优选将蚯蚓进行水洗。通过水洗去除上述金属的氯化物后使蚯蚓与羟基羧酸接触时,可得到酶活性高的蚯蚓干燥粉末。在与羟基羧酸的接触前进行水洗时,与金属的氯化物的接触开始后优选在30分钟以内、更优选在20分以内进行水洗。对水洗方法没有特别的限定,可以采用公知的方法。

[0048] 使活蚯蚓长时间与羟基羧酸粉末接触时会死亡,生命机能消失,不能排泄消化管内的消化物,因此优选尽可能迅速地优选在30秒以内、更优选为20秒以内将羟基羧酸用水稀释,调节pH至2~5的范围。

[0049] 羟基羧酸形成对于蚯蚓不舒适的生活环境,因此活蚯蚓是通过自我保护本能放出体液、排泄物而改善生活环境。另外,羟基羧酸具有杀菌性,因此起到如上所述地促进残留在消化器内的消化物等的排泄的作用,并且可以期待对附着在蚯蚓上的杂菌进行杀菌这样

的效果。

[0050] 上述方法中使用的结晶状羟基羧酸若在使用条件下呈现结晶状体,则可以与其羟基数或羧基数无关地使用。即,单羟基单羧酸、单羟基多羧酸、多羟基单羧酸、多羟基多羧酸的任意者。

[0051] 作为本发明使用的羟基羧酸,例如可列举出:乙醇酸、乳酸、醋酸、 $\beta$ -羟基丙酸、 $\alpha$ -羟基-正丁酸、 $\beta$ -羟基-正丁酸、 $\alpha$ -羟基-正戊酸、 $\beta$ -羟基-正戊酸、苹果酸、 $\alpha$ -甲基苹果酸、 $\alpha$ -羟基戊二酸、 $\beta$ -羟基戊二酸、柠檬酸、丙二酸和琥珀酸等。其中,从对食品可使用且容易获得的方面来看,优选乳酸、醋酸、苹果酸、柠檬酸、丙二酸和琥珀酸。羟基羧酸可以单独使用1种,也可以混合使用2种以上。

[0052] 活蚯蚓的组织的65%为水分。作为活蚯蚓的保命功能运作的时间,有某种程度富余,但若活蚯蚓死亡,则酶将工作,因此放置在不舒适生活环境下的时间的控制必须慎重地进行。该时间受条件的左右,通常处于3~180分钟的范围。

[0053] 对于用羟基羧酸处理的蚯蚓生物体,优选用水清洗后,磨碎制成液态或糊状的磨碎物。清洗优选用水进行。对清洗方法没有特别的限定,可以采用公知的水洗方法。另外,磨碎前的处理工序的总时间、即自将金属的氯化物撒于活蚯蚓后直至用水清洗羟基羧酸结束的时间,优选总计为240分钟以内。

[0054] 对上述磨碎方法没有特别的限定,例如使用均化器、混合器、均质混合器、擂溃机、加压型细胞破坏装置,通常在1~25℃下进行。从蚯蚓构成成分的分解抑制的观点来看,优选在低温下进行,优选为2~15℃的温度。

[0055] 通过蚯蚓的磨碎而得到的磨碎物收纳在例如不锈钢制托盘中,实施冷冻干燥。此时,蚯蚓生物体包含的酶虽不作用于活细胞,但对死细胞瞬间作用,因此存在产生腐败性气体的担心,为了防止该情况,优选瞬间急速冷却/冷冻至-18℃~-35℃,抑制酶的作用后,进行冷冻干燥。

[0056] 如此,为了无损蚯蚓本来的药理作用地进行粉末化,优选迅速地冷冻,另一方面,以过短时间冷冻时,与作为蚯蚓糊的主要成分的蛋白质一同存在的杂质形成点状的不结冻部分,有时不能分离,因此过度地急速冷冻是不优选的。因此,冷冻优选在-18℃~-35℃的低温下需要进行进行20~240小时、更优选50~170小时。

[0057] 冷冻干燥时,选择能够将水分与杂质一起去掉而不会残留的条件是重要的。因此,优选在压力50Pa以下、-60℃~+90℃的温度内,一边阶段性地提高温度一边控制在10~60小时的范围进行。

[0058] 作为冷冻干燥的方法,例如如前所述将磨碎物在-18℃~-35℃的温度下需要冷冻20~240小时后,边于-60℃~+90℃的温度分数阶段进行升温,在压力25~40Pa分数阶段进行减压,边使其冷冻真空干燥10~60小时,由此可以得到无菌状态的淡黄色蚯蚓干燥粉末。

[0059] 进一步,优选具备:将前述磨碎物冷冻干燥而成的物质溶解于水或乙醇水溶液,去除或分离不溶性组分的工序。去除或分离不溶性组分工序可与上述同样地进行经由放置的沉淀、离心、过滤等。优选边搅拌或振动边进行溶解于水或乙醇水溶液的工序。溶解于水所需的时间优选为1~120分钟,更优选为5~80分钟。对乙醇水溶液的乙醇浓度没有特别的限制,优选为10~70% (v/v),更优选为30~60%。

[0060] 对于本发明的 $\beta$ 淀粉样蛋白纤维分解剂、治疗药、预防药和食品组合物,可以如上



所述将溶解于水或乙醇水溶液而成的物质的上清液直接以水溶液的状态使用,也可以蒸发水分制成浓缩液使用,也可以使其干燥制成粉末状使用。也可将上清液干燥制成粉末状后溶解于水中使用。另外,也可以将蚯蚓糊冷冻干燥成的粉末不溶解于水或乙醇水溶液而直接使用。

[0061] 另外,本发明中,作为去除方法,优选如下进行:将活蚯蚓置于不舒适环境下处理之前,即,使上述活蚯蚓接触金属的氯化物或羟基羧酸之前,将活蚯蚓移至面包箱那样的扁箱中,放置于亮处10~50小时,去除附着于表皮附着的污物。在亮处的放置时间更优选为12~24小时。作为此时的容纳量,优选蚯蚓堆积为30~60mm,优选为40~50mm的厚度的程度的量。在该扁箱内,使砂、泥这样的异物不存在,并且蚯蚓为夜行性且在暗处生活活动变得活跃,存在消耗体力的担心,因此优选夜间利用电照培养方式等保持明亮。经该处置的活蚯蚓发挥自我防御本能,排泄消化管内残留的消化物,用该排泄物覆盖全身,防止水分蒸发,以维持生活环境,因此该覆盖的污物即通过适当的手段反复剥取排泄物,则最终可以去除消化管内的消化物和附着于表皮上的污物。

[0062] 附着于蚯蚓的表皮上的污物的剥取例如可以用无纺布覆盖活蚯蚓,使污物吸附在其上来进行。通过将该亮处的放置和去除表皮上附着的污物和与上述金属的氯化物和/或羟基羧酸的接触进行组合,可以期待蚯蚓体内的有毒物质的进一步排出、去除。

[0063] 本发明中,作为得到蚯蚓的干燥粉末的方法,尤其从干燥粉末的保存稳定性的观点来看,优选下述方法。

[0064] (A-1)一种蚯蚓的干燥粉末的制造方法,其具备以下工序:使活蚯蚓与选自钾、钠、镁和钙组成的组中的至少1种金属的氯化物接触,

[0065] 其后,使粉末状羟基羧酸与活蚯蚓接触,用水稀释调节至pH2~5,保持3~180分钟后,将活蚯蚓水洗、磨碎,将得到的磨碎物进行冷冻干燥。

[0066] (A-2)一种蚯蚓的干燥粉末的制造方法,其具备以下工序:使活蚯蚓与选自钾、钠、镁和钙组成的组中的至少1种金属的氯化物接触,

[0067] 其后,将活蚯蚓浸渍在调节至pH2~5的羟基羧酸水溶液中,保持3~180分钟后,将活蚯蚓水洗、磨碎,将得到的磨碎物进行冷冻干燥。

[0068] (A-3)一种蚯蚓的干燥粉末的制造方法,其具备以下工序:将前述(A-1)或(A-2)中的前述磨碎物冷冻干燥而成的物质溶解于水或乙醇水溶液,去除或分离不溶性组分后,进一步进行冷冻干燥。

[0069] 另外,将活蚯蚓磨碎而成的磨碎物冷冻干燥后,从干燥物的杀菌的观点来看,可以将得到的干燥物加热处理。加热处理的温度优选为110℃以上且不足130℃。若加热温度不足110℃,则有时干燥物的杀菌不充分,若为130℃以上,则蚯蚓干燥物包含的酶失活而活性下降,故不优选。更优选为115~125℃。对加热方法没有特别的限定,可列举出吹热风的方法、使用加热夹套的方法、载于托盘等用加热器进行加热的方法、使用定温恒温器的方法等。加热时间优选为30秒~130分钟,更优选为30分钟~90分钟,进一步优选为60分钟~90分钟。加热时间过短则有时杀菌不充分,过长则酶活性失活,故不优选。需要说明的是,由于对液体中的酶进行上述加热处理时酶活性失活,所以优选对蚯蚓的干燥粉末进行加热处理。

[0070] 本发明中,作为得到蚯蚓的磨碎物的方法,优选下述方法。

[0071] (B-1) 一种蚯蚓的磨碎物的制造方法,其具备以下工序:使活蚯蚓与选自钾、钠、镁和钙组成的组中的至少1种金属的氯化物接触,

[0072] 其后,使粉末状羟基羧酸与活蚯蚓接触,用水稀释调节至pH2~5,保持3~180分钟后、将活蚯蚓水洗、磨碎。

[0073] (B-2) 一种蚯蚓的磨碎物的制造方法,使活蚯蚓与选自钾、钠、镁和钙组成的组中的金属的氯化物接触,

[0074] 其后,将活蚯蚓浸渍在调节至pH2~5的羟基羧酸水溶液中,保持3~180分钟后,将活蚯蚓水洗、磨碎。

[0075] 本发明中,作为得到蚯蚓的提取物的方法,优选下述方法。

[0076] (C-1) 一种蚯蚓的提取物的制造方法,其具备以下的工序:使活蚯蚓与选自钾、钠、镁和钙组成的组中的至少1种金属的氯化物接触,

[0077] 其后,使粉末状羟基羧酸与活蚯蚓接触,用水稀释调节至pH2~5,保持3~180分钟后,将活蚯蚓水洗、磨碎,将得到的磨碎物冷冻干燥而成的物质溶解于水或乙醇水溶液,去除或分离不溶性组分。

[0078] (C-2) 一种蚯蚓的提取物的制造方法,其具备以下的工序:使活蚯蚓与选自钾、钠、镁和钙组成的组中的金属的氯化物接触,

[0079] 其后,将活蚯蚓浸渍在调节至pH2~5的羟基羧酸水溶液中,保持3~180分钟后,将活蚯蚓水洗、磨碎,将得到的磨碎物冷冻干燥而成的物质溶解于水或乙醇水溶液,去除或分离不溶性组分。

[0080] 实施例

[0081] 以下,通过实施例来进一步详细地说明本发明。本发明不受以下实施例的任何限制。需要说明的是,以下“%”没有特别说明均为质量基准。

[0082] [蚯蚓干燥粉末的制备]

[0083] 在亮处放置24小时后,将剥掉附着于表皮的污物的活红蚯蚓30kg在平盘上平铺成约5cm的厚度,在其上均匀地撒上氯化钠250g。20分钟后将蚯蚓水洗。其后,将同样撒上柠檬酸250g之后以15秒加入纯水30升进行稀释。此时,刚加入水后的pH为2.25,完全稀释时的pH为2.74。撒上柠檬酸粉末则蚯蚓一下子释放出黄色的体液。用水稀释后,在该状态保持20分钟。接着,从污浊的柠檬酸水溶液中取出活蚯蚓,水洗后,使用均化器在10℃下磨碎,制备蚯蚓糊。接着,对该蚯蚓糊进行抽吸脱气,去除其中包含的气体之后,移至不锈钢制托盘,瞬间急冷至-35℃,在该温度维持50小时缓缓冷冻。将冷冻的蚯蚓糊在-35℃将压力0Pa保持2小时,然后升温至温度25℃,在40Pa下干燥10小时,接着在40℃、压力35Pa下干燥14小时,接着在65℃、压力35Pa下干燥12小时,最后温度设定为80℃、压力25Pa下保持6小时,由此进行真空冷冻干燥。通过该处理得到含水量8质量%的淡黄色的蚯蚓干燥粉末。

[0084] [蚯蚓干燥粉末提取液的制备]

[0085] 从上述得到的蚯蚓干燥粉末采集25g,加入蒸馏水500mL,在室温下搅拌1小时来提取。将得到的提取液离心分离(10000×g、4℃、15分钟),采集上清液。

[0086] 将上述得到的提取液的上清液用包含150mM氯化钠的50mM磷酸盐缓冲液pH7.0(以下buffer(缓冲液))稀释成以蚯蚓干燥粉末量换算计为25mg/mL。其后,离心分离(10000×g、4℃、15分钟)并采集上清液,制备蚯蚓干燥粉末提取液。

[0087] [β淀粉样蛋白纤维的制备]

[0088] 用75%三氟乙醇将β淀粉样蛋白42(肽研究所公司制造Amiloidβ-Protein (Human1-42), 4349-v, Lot. 650312) 溶解成0.5mM, 进一步使用包含150mM氯化钾的50mM磷酸盐缓冲液pH7.0调节成25μM。将该溶液在25℃下培养2周使其纤维化。将其离心分离(14000 × g、25℃、20分钟)回收纤维, 用buffer调节至25μM, 进一步进行10分钟超声波浴, 得到含β淀粉样蛋白纤维的溶液。

[0089] [β淀粉样蛋白纤维分解测定方法]

[0090] 将上述制备的含β淀粉样蛋白纤维的溶液(179容量部)与蚯蚓干燥粉末提取液(1容量份)混合, 在37℃培养。在0分钟和240分钟对混合溶液进行取样。在取样的混合溶液180 μL中加入200μM硫黄素T(以下ThT、Sigma-Aldrich Co. T3516-5G、Lot. 088K1665) 30μL, 用荧光光度计(BIO-RAD公司制造的VersaFluor, 使用激发波长滤波器440nm和测定波长滤波器485nm)对通过与β淀粉样蛋白纤维结合而ThT发出的荧光发光量测定3次。根据测定的ThT的荧光发光量的平均值, 将0小时的荧光发光率设定为100%, 由下式求出240分钟后的荧光发光率。需要说明的是, ThT为与淀粉样纤维特异性结合而发出荧光的有机小分子。

$$[0091] \quad 240\text{分钟后的荧光发光率}(\%) = \frac{240\text{分钟后的荧光发光量(平均)}}{0\text{分钟的荧光发光量(平均)}} \times 100$$

[0092] 同样, 将上述制备的含β淀粉样蛋白纤维的溶液不与蚯蚓干燥粉末提取液混合, 作为对照组与buffer混合, 测定ThT发出的荧光发光量, 求出240分钟后的荧光发光率。

[0093] 将ThT发出的荧光发光量分别示于表1、2。另外, 将240分钟后的荧光发光率示于表3和图1。

[0094] [表1]

[0095] 含β淀粉样蛋白纤维的溶液的ThT荧光发光量

	0分钟	240分钟
比较例1	2364	1894
[0096] 比较例2	2363	1829
比较例3	2381	1856
平均	2369	1860

[0097] [表2]

[0098] 含β淀粉样蛋白纤维的溶液与蚯蚓干燥粉末提取液的混合溶液的ThT荧光发光量

	0分钟	240分钟
[0099] 实施例1	2347	1035
实施例2	2391	962
实施例3	2397	986
[0100] 平均	2378	994

[0101] [表3]

[0102] 240分钟后的荧光发光率的比较

	0分钟	240分钟
[0103] 含 $\beta$ 淀粉样蛋白纤维的溶液	100.00%	78.49%
含 $\beta$ 淀粉样蛋白纤维的溶液与蚯蚓干燥粉末提取液的混合溶液	100.00%	41.81%

[0104] 与蚯蚓干燥粉末提取液的混合溶液的情况下, ThT荧光发光率大幅减少, 因此可知蚯蚓干燥粉末发挥分解 $\beta$ 淀粉样蛋白纤维的作用。

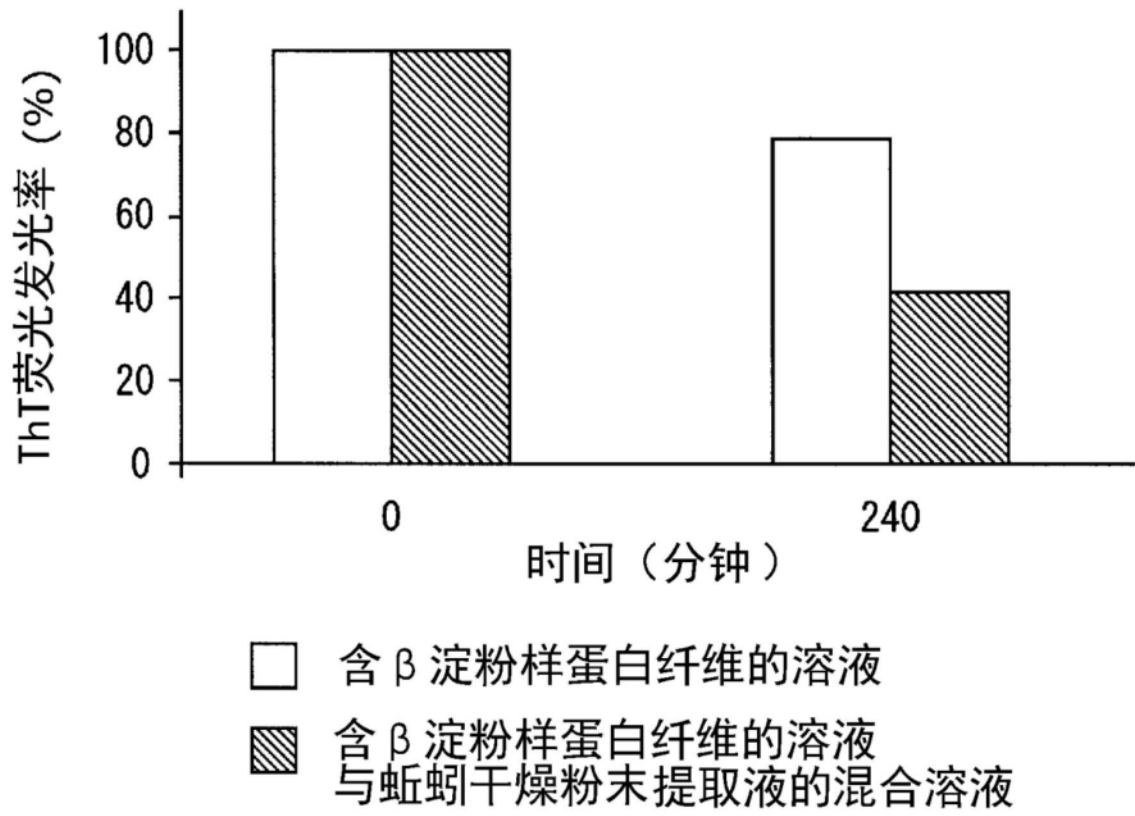


图1