(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 9 月 8 日(08.09.2017)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2017/150327 A1

(51) 国際特許分類:
A23L 33/18 (2016.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) *C07K 5/068* (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01) *C07K 5/09* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/006800

(22) 国際出願日: 2017 年 2 月 23 日(23.02.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2016-041191 2016 年 3 月 3 日(03.03.2016) JP

(71) 出願人 (日本を除く全ての指定国について): 不二製油グループ本社株式会社 **(FUJI OIL HOLDINGS INC.)** [JP/JP]; 〒5988540 大阪府泉佐野市住吉町１番地 Osaka (JP).

(71) 出願人 (日本についてのみ): 不二製油株式会社 **(FUJI OIL CO., LTD.)** [JP/JP]; 〒5988540 大阪府泉佐野市住吉町１番地 Osaka (JP).

(72) 発明者: 片山　茂 **(KATAYAMA, Shigeru)**; 〒3994598 長野県上伊那郡南箕輪村８３０４　国立大学法人信州大学農学部内 Nagano (JP). 三谷　塁一 **(MITANI, Takakazu)**; 〒3994598 長野県上伊那郡南箕輪村８３０４　国立大学法人信州大学農学部内 Nagano (JP). 中村　宗一郎 **(NAKAMURA, Soichiro)**; 〒3994598 長野県上伊那郡南箕輪村８３０４　国立大学法人信州大学農学部内 Nagano (JP). 前渕　元宏 **(MAEBUCHI, Motohiro)**; 〒3002436 茨城県つくばみらい市絹の台４丁目３番地　不二製油株式会社　つくば研究開発センター内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所 **(SAEGUSA & PARTNERS)**; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町１－７－１　北浜ＴＮＫビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

WO 2017/150327 A1

(54) **Title**: FOOD ADDITIVE COMPOSITION FOR PROMOTING IN-BRAIN SECRETION OF NEUROTROPHINS

(54) 発明の名称 : 神経栄養因子の脳内分泌促進するための食品添加用組成物

(57) **Abstract**: The present invention addresses the problem of providing a food material that is added to food to promote in-brain secretion of neurotrophins including BDNF, and that can endow the food with a brain function improvement function and a cranial nerve disease prevention function. An oligopeptide mixture containing a tripeptide or a dipeptide having lysine and/or arginine as a constituent amino acid allows neurotrophins in the brain to be increased with good efficiency.

(57) 要約: 本発明は、食品に添加することで BDNF を含む神経栄養因子の脳内分泌を促進し、脳神経疾患の予防機能や脳機能改善機能を食品に付加することのできる食品素材を提供することを課題とする。　構成アミノ酸としてリジン及び/またはアルギニンを有するジペプチドもしくはトリペプチドを含有するオリゴペプチド混合物が、脳内の神経栄養因子を効率よく増加させることができる。

明　細　書

発明の名称 ：

神経栄養因子の脳内分泌促進するための食品添加用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、神経栄養因子の脳内分泌促進するための食品添加用組成物に関するものである。

背景技術

[0002] 老齢人口の増加と共に、アルツハイマー病を含む老人性痴呆患者数が増加している。厚生労働省によると、2012年の認知症患者数は462万人（65歳以上の7人に1人）から、2030年には830万人になると推測されている。一方、認知症予備軍を軽度認知障害（Mild Cognitive Impairment: MCI）と呼び、MCIと診断されたら、生活改善による予防が必要となる。認知症患者が2012年から2030年で1.8倍になるので、同じ割合で増加すると仮定して試算すると、2030年のMCI患者数は720万人と推測される。一方、仕事環境、家庭的事情、人間関係などの様々なストレスによるうつ病など、脳のトラブルを抱えている患者数は年々増加している。近年の研究で、食品成分が脳の機能に影響を及ぼすことが明らかになり、脳機能改善、抗うつ、抗認知症などに関する効果を有する食品成分が注目されている。

[0003] 神経栄養因子（Neurotrophin）とは神経細胞の発生・成長・維持・再生を促進させる物質の総称であり、これまでに様々な栄養因子が同定されている。その中で、脳由来神経栄養因子（Brain-Derived Neurotrophic Factor: BDNF）は神経細胞の生存維持、神経突起の伸張促進、神経伝達物質の合成促進などの作用を示す。なお、これらのBDNFの機能は高親和性受容体（TrkB）を介する（非特許文献１，２）。

BDNFは、アルツハイマー病、うつ病などの精神神経疾患との関連が報告されている。アルツハイマー病の患者の脳では、特に大脳皮質や海馬において、BDNFとTrkBのレベルが健常者よりも低い。健常者では前頭前野においてTrk

B mRNAレベルが加齢に伴い減少する。ラットでは加齢に伴う空間記憶の低下と、海馬のBDNF mRNA発現量の減少が相関することが示されている。これらの事実は、加齢及びアルツハイマー病における記憶低下に、BDNF作用の減少の関与が示唆されている（非特許文献３）。

BDNFとうつ病との関連を示すデータも報告されている（非特許文献４）。うつ病患者の脳では、海馬を含むいくつかの領域でBDNF蛋白量の減少が認められる。うつ病のモデル動物では海馬のセロトニンン作動性神経線維の脱落が認められるが、BDNFはセロトニン作動性ニューロンの生存維持に作用する。

[0004] したがって、BDNFを含む神経栄養因子の脳内レベルを増加させることにより、脳機能の低下に起因する症状あるいは疾患を予防し、さらに改善効果を示し、安全性の高い食品原料の開発が強く望まれている。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Huang EJ and Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. Annu. Rev. Neurosci. 2001, 24, 677.

非特許文献2：Schinder AF and Poo M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. Trends Neurosci. 2000; 23: 639-645.

非特許文献3：Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. Brain Res. Rev. 2008; 59: 201-220.

非特許文献4：Erickson KI, Miller DL, Roecklein KA. The aging hippocampus: interactions between exercise, depression, and BDNF. Neuroscientist. 2015; 18: 82-97.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、食品に添加することでBDNFを含む神経栄養因子の脳内分泌を促

進し、脳神経疾患の予防機能や脳機能改善機能を食品に付加することのできる食品素材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

[0007] 本発明者らは、脳内神経栄養因子レベルを効率よく増加させる安全性の高い食品素材を鋭意研究した結果、構成アミノ酸としてリジン及び/またはアルギニンを有するジペプチドもしくはトリペプチドを含有するオリゴペプチド混合物が、脳内の神経栄養因子を効率よく増加させることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0008] すなわち、本発明は、

（１）構成アミノ酸としてリジン及び/またはアルギニンを有するジペプチドまたはトリペプチドを含有するオリゴペプチド混合物を有効成分とする、神経栄養因子の脳内分泌促進するための食品添加用組成物、

（２）オリゴペプチド混合物中の全アミノ酸量に対するリジン及び/またはアルギニンの量の割合が５重量％以上である、（１）記載の神経栄養因子の脳内分泌促進するための食品添加用組成物、

（３）オリゴペプチド混合物中の分子量５００未満のペプチド含量がペプチド及び遊離アミノ酸の合計量に対して５０重量％以上である、（１）または（２）記載の神経栄養因子の脳内分泌促進するための食品添加用組成物、

（４）構成アミノ酸としてリジン及び/またはアルギニンを有するジペプチドまたはトリペプチドを含有するオリゴペプチド混合物を有効成分とする、神経栄養因子の脳内分泌促進剤、

（５）神経栄養因子の脳内分泌促進のために用いられる食品を製造するために、構成アミノ酸としてリジン及び/またはアルギニンを有するジペプチドまたはトリペプチドを、食品に有効成分として添加して使用する方法、

である。

発明の効果

[0009] 本発明の特定のジペプチド又はトリペプチドを有効成分として摂取することにより、BDNFのような神経栄養因子の脳内分泌を促進させることができる

。これにより、種々の脳神経疾患の予防や脳機能の改善に役立てることができる。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明の実施形態について詳細に説明する。

[0011] （オリゴペプチド混合物）

オリゴペプチド混合物は特定のアミノ酸配列のみを有するペプチドではなく、様々なアミノ酸配列と分子量を有するペプチドの混合物である。

本発明の食品添加物として使用されるオリゴペプチド混合物は、一つの態様として蛋白質原料を酸で加水分解した蛋白質の酸加水分解物もしくは蛋白質加水分解酵素（プロテアーゼ）により酵素分解した蛋白質の酵素分解物であることができる。それ以外に、化学合成法や酵素法により常法で調製することもできる。

[0012] 以下、酵素分解法によりオリゴペプチド混合物を得る態様について説明する。

蛋白質原料としては、動物性又は植物性の天然原料から蛋白質を抽出，濃縮，又は分離した各種蛋白質原料を用いることができ、該蛋白質原料中の好適な蛋白質含量は乾燥重量換算で５０重量％以上、好ましくは７０重量％以上、より好ましくは８０重量％以上、さらに好ましくは９０重量％以上である。

動物性の蛋白質原料の由来としては、乳，卵，家畜肉，魚介肉，微生物などがあり、植物性の蛋白質原料の由来としては、大豆，エンドウ豆等の豆類や、米，小麦，大麦，トウモロコシ等の穀類等、アーモンド、カシューナッツ、クルミ、ピスタチオ、ヘーゼルナッツ、マダカミアンナッツ等のナッツ類が挙げられる。

[0013] この中でも、蛋白質のアミノ酸配列中に塩基性アミノ酸であるリジンやアルギニン残基及びグリシンのような中性アミノ酸を多く含むのが好ましく、そのような例としては、大豆，乳，家畜肉，魚介肉，卵等が挙げられ、さらに大豆が好ましい。大豆の場合、豆乳（全脂、脱脂等を問わない），濃縮大

豆蛋白，分離大豆蛋白，分画大豆蛋白などを使用することができる。特に少量の摂取でより多量のオリゴペプチドを摂取できるようにしたい場合には、乾燥重量換算で８０重量％以上の高い蛋白質含量を持つ分離大豆蛋白や分画大豆蛋白の使用が好ましい。

[0014] 蛋白質原料を蛋白質加水分解酵素（プロテアーゼ）により酵素分解、酵素分解の程度は、全ての分子が遊離アミノ酸にまで分解されていないことが適当であり、分解度がより高いことが好ましい。特にオリゴペプチド混合物中、分子量５００未満のペプチド画分の含量が、ペプチド及び遊離アミノ酸の合計量に対して５０重量％以上、好ましくは６０重量％以上となる程度が適当である。

[0015] この分子量５００未満のペプチドは、アミノ酸が２～３分子結合したジペプチドおよびトリペプチドから実質的に構成されるものである。

オリゴペプチド混合物の分子量が大きすぎると吸収速度の優位性が少なくなり、神経栄養因子分泌促進の効果が減殺される可能性がある。

なお、分子量５００未満のペプチドの含量は、ペプチド用ゲルろ過クロマトグラフィーによりオリゴペプチド混合物における分子量５００未満のペプチド及び遊離アミノ酸画分の割合を測定した後、アミノ酸分析により算出した蛋白質加水分解物中の遊離アミノ酸含量を差し引くことにより算出するものとする。

[0016] また、上記のように特定されるオリゴペプチド混合物は分子量５００未満のペプチド以外のペプチド及び遊離アミノ酸の割合ができるだけ低減されたものが好ましい。すなわち、オリゴペプチド混合物中の遊離アミノ酸の含量は、ペプチド及び遊離アミノ酸の合計量に対して１２重量％以下、好ましくは５重量％以下となる程度が適当である。遊離アミノ酸が多くなりすぎると大量摂取による問題を生じる可能性があるためである。

[0017] さらに、該オリゴペプチド混合物中のペプチド体はより低分子であることが望ましいことから、オリゴペプチド混合物中の分子量５００以上の画分の割合がペプチド及び遊離アミノ酸の合計量に対して４０重量％以下であるこ

とが好ましく、３８重量％以下であることがより好ましく、３５重量％以下がさらに好ましい。

[0018] オリゴペプチド混合物を得るために酵素分解に使用されるプロテアーゼは、動物起源、植物起源又は微生物起源を問わず、プロテアーゼの分類において「金属プロテアーゼ」，「酸性プロテアーゼ」，「チオールプロテアーゼ」，「セリンプロテアーゼ」に分類されるプロテアーゼ、好ましくは「金属プロテアーゼ」、「チオールプロテアーゼ」、「セリンプロテアーゼ」に分類されるプロテアーゼの中から適宜選択することができる。

[0019] 特に２種類以上、あるいは３種類以上の異なった分類に属する酵素を、順次若しくは同時に併用して作用させる分解方法が分子量５００未満のペプチドの割合を増加させることができ、効率的で好ましい。

さらに、遊離アミノ酸の含量を減らすにはエキソプロテアーゼ活性の少ない酵素を使用することが好ましい。

[0020] このプロテアーゼの分類は、酵素科学の分野において通常行われている活性中心のアミノ酸の種類による分類方法である。

各々の代表として「金属プロテアーゼ」にはBacillus由来中性プロテアーゼ，Streptomyces由来中性プロテアーゼ，Aspergillus由来中性プロテアーゼ，『サモアーゼ』等が挙げられ、「酸性プロテアーゼ」にはペプシン，Aspergillus由来酸性プロテアーゼ，『スミチームＦＰ』等が挙げられ、「チオールプロテアーゼ」にはブロメライン，パパイン等が挙げられ、「セリンプロテアーゼ」にはトリプシン，キモトリプシン，ズブチリシン，Streptomyces由来アルカリプロテアーゼ，『アルカラーゼ』，『ビオプラーゼ』等が挙げられる。

[0021] これら以外の酵素でも作用ｐＨや阻害剤との反応性により、その分類を確認することができる。

活性中心が異なる酵素間では、基質への作用部位が大きく異なるため、「切れ残り」を減らし、効率よく酵素分解物を得ることができる。

また、異なった起源の（起源生物）の酵素を併用することで、更に効率よ

く酵素分解物を製造することができる。

同分類でも起源が異なれば、基質である蛋白質への作用部位も異なり、結果として分子量５００未満のペプチドの割合を増やすことができる。

[0022] プロテアーゼ処理の反応ｐＨや反応温度は、用いるプロテアーゼの特性に合わせて設定すれば良く、通常、反応ｐＨは至適ｐＨ付近で行い、反応温度は至適温度付近で行えば良い。

概ね反応温度は２０～８０℃、好ましくは４０～６０℃である。反応後は酵素を失活させるのに十分な温度（６０～１７０℃程度）まで加熱し、残存酵素活性を失活させる。

[0023] プロテアーゼ処理後の反応液は、そのまま又は濃縮して用いることもできるが、通常、殺菌し、噴霧乾燥、凍結乾燥等して乾燥粉末の状態で利用する。

殺菌は、加熱殺菌が好ましく、加熱温度は１１０～１７０℃が好ましく、１３０～１７０℃が更に好ましく、加熱時間は３～２０秒間が好ましい。また、反応液を任意のｐＨに調整してもよい。

[0024] プロテアーゼ処理時やｐＨ調整時に発生する不溶物（沈殿物や懸濁物）を遠心分離やろ過等により除去してもよく、この不溶物の除去はオリゴペプチド混合物中の有効成分の力価を向上させることができるため、好ましい。更に活性炭や吸着樹脂により精製してもよい。

[0025] （構成アミノ酸としてリジン及び/またはアルギニンを含む塩基性アミノ酸ジペプチドまたはトリペプチド：NSPP）

本発明において使用されるオリゴペプチド混合物は、「構成アミノ酸としてリジン及び/またはアルギニンを含む塩基性アミノ酸ジペプチドまたはトリペプチド」〔以下、これを「NSPP」(Neurotrophin Secretion Promoting Peptides)と略する場合がある。〕を含有することが重要である。すなわち、本発明は該NSPPを神経栄養因子の脳内神経細胞からの分泌を促進する有効な成分として作用させることを本質とするものである。

[0026] 該NSPPは、ジペプチドの場合ではリジン残基またはアルギニン残基を１ま

たは２残基含むものであり、１残基のみの場合は、残る残基は中性アミノ酸を含むことが好ましい。トリペプチドの場合はリジン残基またはアルギニン残基を１～３残基含むものであり、1～２残基のみの場合は、残る残基は中性アミノ酸を含むことが好ましい。中性アミノ酸としては、例えば、グリシンが挙げられる。

リジン残基またはアルギニン残基はNSPPのＮ末端又はＣ末端の何れに存在していてもよく、またトリペプチドの場合はアミノ酸配列の中間に存在していても良い。なお、消化管にはアミノ酸トランスポーターとは独立したペプチドトランスポーターが存在し、ジペプチドだけでなくトリペプチドもペプチド態のまま細胞内へと輸送されることが知られているため、実質はトリペプチドはジペプチドを摂取するのと同等である（Adibi SA. The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. Gastroenterology. 1997; 113: 332-340.）。

[0027] またオリゴペプチド混合物中に含まれるNSPPは、リジンまたはアルギニンを含む単一のアミノ酸配列のものだけでなく、リジンまたはアルギニンを含む２種類以上のアミノ酸配列を有するものの混合物であってよい。

本発明で使用されるNSPPの中でも、特にアストロサイトを用いる活性物質のスクリーニングにて神経栄養因子の発現及び分泌がより高いものが好ましく、実施例に記載される方法で測定した場合に、発現または分泌の亢進が溶媒のみのコントロールに較べ1.2倍以上であるのが好ましく、1.3倍以上であるのがより好ましく、1.5倍以上であるのがさらに好ましい。

このような指標を満たすNSPPとしては、例えばジペプチドではLys-Arg, Arg-Lys, Lys-Lys, Arg-Arg, Gly-Arg, Gly-Lys, Lsy-Gly, Pro-Arg, Arg-Pro, Ser-Arg, Arg-Ser, Ala-Arg, Arg-Ala, Ile-Arg, Lys-Ile, Ala-Lys, Val-Arg, Arg-Gly, Val-Lys, Leu-Arg, Arg-Ile, Ser-Lys, Tyr-Arg, Lys-Tyr, Asn-Lys, Lys-Val及びLys-Serからなる群より選択されるのが好ましく、さらに好ましくは、Lys-Arg, Arg-Lys, Lys-Lys, Arg-Arg, Gly-Arg, Gly-Lys, Lsy-Gly, Pro-Arg, Arg-Pro, Ser-Arg, Arg-Ser, Ala-Arg, Arg-Ala, Ile-Arg,

Lys-Ile, Ala-Lys, Val-Arg, Arg-Gly, Val-Lys, Leu-Arg及びArg-Ile、特にLys-Arg, Arg-Lys, Lys-Lys, Arg-Arg, Gly-Arg, Gly-Lys, 及びLys-Glyからなる群より選択されるジペプチドが好ましい。

また、トリペプチドではLys-Gly-Arg, Gly-Arg-Lys, Gly-Lys-Arg, Arg-Pro-Arg, Arg-Ser-Arg, Arg-Ala-Arg, Lys-Ile-Arg, Ser-Arg-Lys, Ser-Lys-Arg, Pro-Arg-Arg, Arg-Ala-Lys, Lys-Tyr-Arg, Lys-Val-Arg, Ala-Arg-Arg, Arg-Gly-Arg, Val-Lys-Arg, Val-Arg-Arg, Leu-Arg-Arg, Val-Arg-Lys, Pro-Arg-Lys, Asn-Lys-Arg, Arg-Ile-Arg及びLys-Ser-Argからなる群より選択されるのが好ましく、さらに好ましくはLys-Gly-Arg, Gly-Arg-Lys, Gly-Lys-Arg, Arg-Pro-Arg, Arg-Ser-Arg, Arg-Ala-Arg及びLys-Ile-Arg、特にLys-Gly-Arg, Gly-Arg-Lys, Gly-Lys-Argからなる群より選択されるトリペプチドが好ましい。

[0028] オリゴペプチド混合物中の全アミノ酸量に対するリジン及びアルギニンの量の割合は高いほどNSPPの量も多くなると考えられるため、より高い方が好ましく、具体的には５重量％以上、８０重量％以下となることが好ましい。

[0029] 必須ではないが、オリゴペプチド混合物中のNSPPの含量をより高めたい場合には、蛋白質原料を蛋白質加水分解酵素により酵素分解した後、蛋白質の酵素分解物をさらに濃縮又は精製することができる。

なお、本発明に使用されるNSPPをオリゴペプチド混合物は、プラステイン反応やアミノ酸リガーゼを用いた酵素法により調製したり、化学的に合成したりして得ることも可能であるが、経済性、効率面、食品原料としての使用を考慮すると、蛋白質の加水分解物から濃縮や精製する方が好ましい。

[0030] 濃縮は吸着剤等を用いてオリゴペプチド混合物中のNSPPを多く含む画分を吸着させることにより行うことができる。

また精製は、オリゴペプチド混合物の溶液にエタノール等の極性有機溶媒を添加し、沈殿物を回収することで、NSPPを多く含む画分を得ることができる（国際公開ＷＯ２００８／１２３０３３号）。

[0031] （NSPPの生理機能）

アストロサイトを用いる活性物質のスクリーニングにて、構成アミノ酸としてリジン及びアルギニンを含む塩基性アミノ酸を有するジペプチド及び/またはトリペプチドを含有するオリゴペプチド混合物として、例えば、Lys-Gly-Arg、Gly-Arg-Lysの配列を持つNSPPがBDNFの発現および分泌を対照と比較して有意に高くなることが、本発明らにより見出された。

[0032] この実証結果から、NSPP、特に好ましくはアストロサイトを用いる活性物質のスクリーニングにて神経栄養因子の発現促進または分泌促進が見られたオリゴペプチドは、これらを摂取することにより、脳内でのBDNFのような神経栄養因子の高い分泌促進効果を示すことが本発明者らにより実証された。

[0033] （NSPPを有するオリゴペプチド混合物を含有する神経栄養因子の脳内分泌促進するための食品添加用組成物）

NSPPを有するオリゴペプチド混合物を含有する神経栄養因子の脳内分泌促進するための食品添加用組成物は様々な食品に配合することができる。例えば、飲料，タブレット，フードバー，肉製品，デザート，菓子類及び栄養補助食品などの製品に配合して使用することができる。

これらの製品はパッケージや広告媒体に脳神経疾患の予防や脳機能の改善の効果が明示されているものであっても良いし、かかる明示がなくとも本発明に係る食品添加物を使用することにより実質的に該効果の付与を販売者が目的とし、又は期待するものであってもよい。

[0034] （脳神経疾患）

脳神経疾患としては、記憶障害、注意障害、遂行機能障害、社会的行動障害などの高次脳機能障害や、これらの障害と病理学的に関連する症状、例えば、脳梗塞、頭部外傷、脳血管性認知症、アルツハイマー型認知症、パーキンソン病、総合失調症、うつ病、不安症などが挙げられる。

[0035] （脳機能改善）

脳機能の改善効果としては、具体的には記憶力改善、学習能向上、注意力改善、ストレス耐性、抗うつ作用、抗不安作用、集中力改善、睡眠の質改善などが挙げられる。

[0036] （遊離アミノ酸及びペプチド含量の測定方法）

オリゴペプチド混合物の分子量分布は、以下のゲルろ過カラムを用いたHPLC法により測定するものとする。

ペプチド用ゲルろ過カラムを用いたHPLCシステムを組み、分子量マーカーとなる既知のペプチドをチャージし、分子量と保持時間の関係において検量線を求める。なお、分子量マーカーは、オクタペプチドとして[β-Asp]-Angiotensin IIのβ-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe（配列番号１；分子量1046）、ヘキサペプチドとしてAngiotensin IVのVal-Tyr-Ile-His-Pro-Phe（配列番号２；分子量775）、ペンタペプチドとしてLeu-EnkephalinのTyr-Gly-Gly-Phe-Leu（配列番号３；分子量555）、トリペプチドとしてGlu-Glu-Glu（分子量405）、遊離アミノ酸としてPro（分子量115）を用いる。

[0037] オリゴペプチド混合物（１％）を10,000rpm、10分間で遠心分離した上清を、ゲルろ過用溶媒で２倍に希釈し、その５μlをHPLCにアプライする。

蛋白質加水分解物中の遊離アミノ酸及び分子量500未満のペプチド画分の割合（％）は、全体の吸光度のチャート面積に対する、分子量500未満の範囲（時間範囲）の面積の割合によって求める（使用カラム：Superdex Peptide 7.5／300GL（ＧＥヘルスケア・ジャパン(株)製）、溶媒：１％SDS／10mMリン酸緩衝液、pH8.0、カラム温度25℃、流速0.25ml／min、検出波長：220nm）。

[0038] また蛋白質加水分解物中の分子量500以上のペプチド画分の割合（％）は、上記と同様に、全体の吸光度のチャート面積に対する、分子量500以上の範囲の面積の割合によって求める。

[0039] 次に、アミノ酸分析により蛋白質加水分解物中の遊離アミノ酸含量の測定を行う。蛋白質加水分解物（４mg／ml）を等量の３％スルホサリチル酸に加え、室温で１５分間振とうする。10,000rpmで１０分間遠心分離し、得られた上澄みを0.45μｍフィルターでろ過し、アミノ酸分析器「JLC500V」（日本電子(株)製）にて、遊離アミノ酸を測定する。

蛋白質加水分解物中の遊離アミノ酸含量はケルダール法にて得られた蛋白質含量に対する割合として算出する。

以上より得られる、「遊離アミノ酸及び分子量５００未満のペプチド画分の割合」から「遊離アミノ酸含量」を差し引いた値を、蛋白質分解物中の「分子量５００未満のペプチドの含量」とする。

実施例

[0040] 以下、組成例、実施例及び実験例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。

[0041] （ペプチド）

本試験で使用したペプチド（Lys-Gly-Arg、Gly-Arg-Lys、Lys-Gly-Arg-Lys（配列番号４）、Gly-Arg-Lys-Gly（配列番号５）、Lys-Gly-Arg-Lys-Gly（配列番号６））は、GenScript社で受託合成したものを用いた。

[0042] （試験方法）

雌性C57BL/6Jマウス（8～10週齢、オリエンタル酵母株式会社製）を妊娠させ、胎齢18日の胎児の脳細胞を単離し、G5-Supplement（Invitrogen社製）を添加したDMEM/F12培地（Invitrogen社製）にてアストロサイトに分化誘導させた。誘導7日後、分化マーカーであるGFAPの陽性割合を調べ、陽性率が95%以上であることを確認した。

マウス胎児脳由来の初代培養アストロサイト（終濃度2×10^5cells/mL）を60mmシャーレに播種し、37℃、5%CO_2の条件下で、4日間CO_2インキュベーターで培養した後、合成ペプチド（終濃度1、10μM）を添加した。コントロールとして培地を使用した。培養6時間後、RNAiso Plus（タカラバイオ社製）を用いてTotal RNAを抽出した。続いて、ReverTra Ace qPCR RT Kit（KAPAバイオシステムズ社）を用いてリアルタイムPCRを行い、脳由来神経栄養因子（BDNF）のmRNA発現量を定量した。内部標準遺伝子β-actinで標準化した。使用したプライマーの配列を表１に示した。

[0043] （表１）プライマーの配列

Name	Sequence (5' to 3')
BDNF forward	TAACGGCGGCAGACAAAAAGA(配列番号7)
BDNF reverse	GAAGTATTGCTTCAGTTGGCCT(配列番号8)
β-actin forward	AGTGTGACGTGGACATCCGCA(配列番号9)
β-actin reverse	GCCAGGGCAGTGATCTCCTTCT(配列番号10)

[0044] (実施例１～２）トリペプチドの検討

トリペプチドとして、KGR (Lys-Gly-Arg) （実施例１）、GRK (Gly-Arg-Lys) （実施例２）を初代培養アストロサイトに添加して、脳由来神経栄養因子 (BDNF) のmRNA発現量を調べた。

表１に結果を示した。いずれのトリペプチドの場合もBDNFのmRNA発現量が有意に増加することが確認された。

[0045] (表１)

KGR, BDNF mRNA (実施例1)

	Rel. Qty	SD	TTEST
Control	1.0	0.0	
1μM	1.7	0.4	0.045
10μM	2.2	0.6	0.094

GRK, BDNF mRNA (実施例2)

	Rel. Qty	SD	TTEST
Control	1.0	0.0	
1μM	1.7	0.2	0.010
10μM	1.8	0.5	0.070

[0046] (比較例１～２）テトラペプチドの検討

テトラペプチドとして、KGRK (Lys-Gly-Arg-Lys) （配列番号４：比較例１）、GRKG (Gly-Arg-Lys-Gly) （配列番号５：比較例２）について、実施例１と同様にBDNFのmRNA発現量を調べた。

表２に結果を示した。いずれのテトラペプチドもBDNFのmRNA発現量は有意に増加しなかった。

[0047] （表２）

KGRK, BDNF mRNA（比較例1）

	Rel. Qty	SD	TTEST
Control	1.0	0.2	
1μM	0.8	0.2	0.42
10μM	0.9	0.2	0.77

GRKG, BDNF mRNA（比較例2）

	Rel. Qty	SD	TTEST
Control	1.0	0.2	
1μM	1.0	0.2	0.93
10μM	1.1	0.1	0.93

[0048] （比較例３）ペンタペプチドの検討

ペンタペプチドとして、KGRKG（Lys-Gly-Arg-Lys-Gly）（配列番号６：比較例３）について、実施例１と同様にBDNFのmRNA発現量を調べた。

表３に結果を示した。ペンタペプチドはBDNFのmRNA発現量を有意に増加しなかった。

[0049] （表３）

KGRKG, BDNF mRNA（比較例3）

	Rel. Qty	SD	TTEST
Control	1.0	0.3	
1μM	1.0	0.2	0.82
10μM	0.9	0.0	0.30

請求の範囲

[請求項1] 構成アミノ酸としてリジン及び/またはアルギニンを有するジペプチドまたはトリペプチドを含有するオリゴペプチド混合物を有効成分とする、神経栄養因子の脳内分泌促進するための食品添加用組成物。

[請求項2] オリゴペプチド混合物中の全アミノ酸量に対するリジン及び/またはアルギニンの量の割合が５重量％以上である、請求項１記載の神経栄養因子の脳内分泌促進するための食品添加用組成物。

[請求項3] オリゴペプチド混合物中の分子量５００未満のペプチド含量がペプチド及び遊離アミノ酸の合計量に対して５０重量％以上である、請求項１または２記載の神経栄養因子の脳内分泌促進するための食品添加用組成物。

[請求項4] 構成アミノ酸としてリジン及び/またはアルギニンを有するジペプチドまたはトリペプチドを含有するオリゴペプチド混合物を有効成分とする、神経栄養因子の脳内分泌促進剤。

[請求項5] 神経栄養因子の脳内分泌促進のために用いられる食品を製造するために、構成アミノ酸としてリジン及び/またはアルギニンを有するジペプチドまたはトリペプチドを、食品に有効成分として添加して使用する方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/006800

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A23L33/18(2016.01)i, *A61K38/00*(2006.01)i, *A61P25/24*(2006.01)i, *A61P25/28*(2006.01)i, *C07K5/068*(2006.01)n, *C07K5/09*(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A23L33/18, A61K38/00, A61P25/24, A61P25/28, C07K5/068, C07K5/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/BIOTECHO/SCISEARCH/TOXCENTER(STN), CAplus/REGISTRY(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012/0208747 A1 (SUNGYUNKWAN UNIVERSITY FOUNDATION FOR CORPORATE COLLABORATION), 16 August 2012 (16.08.2012), paragraphs [0020], [0021]; examples 2 to 4; table 1; fig. 2; claims 1, 6, 8, 11, 12 & WO 2011/055880 A1 & KR 10-2011-0050134 A	1-5
P,X	Ayano SHIMIZU et al., "Daizu Yurai Enkisei Peptide no BDNF Sansei Sokushin Koka", Japanese Society of Food Chemistry Dai 22 Kai Sokai· Gakujutsu Taikai Koen Yoshishu, 02 June 2016 (02.06.2016), page 106	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 April 2017 (13.04.17)	25 April 2017 (25.04.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/006800

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHIN M.-K. et al., A novel brain-derived neurotrophic factor-modulating peptide attenuates Aβ1-42-induced neurotoxicity in vitro, Neuroscience Letters, 2015, Vol.595, p.63-68	1-5
A	WO 2015/054006 A2 (TARIX PHARMACEUTICALS LTD.), 16 April 2015 (16.04.2015), & JP 2017-501967 A & US 2015/0105335 A1 & EP 3054967 A1 & KR 10-2016-0065969 A & CN 105828831 A	1-5
A	JP 2007-137811 A (Lion Corp.), 07 June 2007 (07.06.2007), (Family: none)	1-5
A	SEREDENIN S. B. et al., Antidepressant Effect of Dimeric Dipeptide GSB-106, an Original Low-Molecular-Weight Mimetic of BDNF, Acta Naturae, 2013, Vol.5, No.4, p.105-109	1-5
A	FLETCHER J. M. et al., Design of a Conformationally Defined and Proteolytically Stable Circular Mimetic of Brain-derived Neurotrophic Factor, The Journal of Biological Chemistry, 2008, Vol.283, No.48, p.33375-33383	1-5

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１７／００６８００

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A23L33/18(2016.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P25/24(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, C07K5/068(2006.01)n, C07K5/09(2006.01)n

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A23L33/18, A61K38/00, A61P25/24, A61P25/28, C07K5/068, C07K5/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１７年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１７年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１７年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/ MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/BIOTECHO/SCISEARCH/TOXCENTER (STN), CAplus/REGISTRY(STN)

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	US 2012/0208747 A1 (SUNGYUNKWAN UNIVERSITY FOUNDATION FOR CORPORATE COLLABORATION) 2012.08.16, 段落 0020, 0021, Example 2-4, Table 1, FIG.2, claim 1, 6, 8, 11,12 等 & WO 2011/055880 A1 & KR 10-2011-0050134 A	1-5
P, X	清水綾乃　他, 大豆由来塩基性ペプチドのＢＤＮＦ産生促進効果, 日本食品化学学会 第 22 回総会・学術大会講演要旨集, 2016.06.02, p.106	1-5

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１３．０４．２０１７	２５．０４．２０１７

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　４５０１
北村　悠美子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	SHIN M.-K. et al., A novel brain-derived neurotrophic factor-modulating peptide attenuates Aβ1-42-induced neurotoxicity in vitro, Neuroscience Letters, 2015, Vol.595, p.63-68	1-5
A	WO 2015/054006 A2 (TARIX PHARMACEUTICALS LTD) 2015.04.16, & JP 2017-501967 A & US 2015/0105335 A1 & EP 3054967 A1 & KR 10-2016-0065969 A & CN 105828831 A	1-5
A	JP 2007-137811 A（ライオン株式会社）2007.06.07,（ファミリーなし）	1-5
A	SEREDENIN S. B. et al., Antidepressant Effect of Dimeric Dipeptide GSB-106, an Original Low-Molecular-Weight Mimetic of BDNF, Acta Naturae, 2013, Vol.5, No.4, p.105-109	1-5
A	FLETCHER J. M. et al., Design of a Conformationally Defined and Proteolytically Stable Circular Mimetic of Brain-derived Neurotrophic Factor, The Journal of Biological Chemistry, 2008, Vol.283, No.48, p.33375-33383	1-5