

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-201749

(P2008-201749A)

(43) 公開日 平成20年9月4日(2008.9.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 36/07 (2006.01)	A 6 1 K 35/84 A	4 C 0 8 8
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 10 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-41434 (P2007-41434)
 (22) 出願日 平成19年2月21日 (2007.2.21)

(71) 出願人 504147243
 国立大学法人 岡山大学
 岡山県岡山市津島中一丁目1番1号
 (71) 出願人 504258527
 国立大学法人 鹿児島大学
 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号
 (74) 代理人 100065215
 弁理士 三枝 英二
 (74) 代理人 100076510
 弁理士 掛樋 悠路
 (74) 代理人 100108084
 弁理士 中野 睦子

最終頁に続く

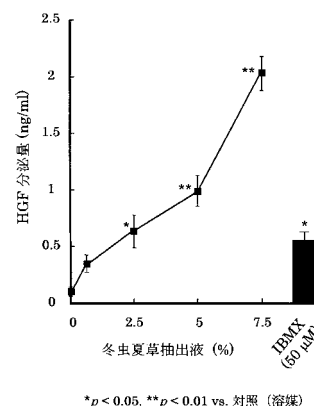
(54) 【発明の名称】 肝細胞増殖因子産生誘導剤及びその医薬品組成物

(57) 【要約】

【課題】肝細胞増殖因子の産生を誘導することで、肝疾患、心疾患、血管疾患、脳疾患、腎疾患、消化器疾患、皮膚疾患、肺疾患、及び神経性の疾患を予防及び改善するために有効に使用できる肝細胞増殖因子産生誘導剤を提供する。

【解決手段】肝細胞増殖因子産生誘導剤の有効成分として、天然の植物成分に由来する、冬虫夏草の粉碎物、あるいはその抽出成分を用いる。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

冬虫夏草加工処理物を有効成分とする肝細胞増殖因子産生誘導剤。

【請求項 2】

冬虫夏草から得られる物質であって、その分子量が 25,000 以上 2,000,000 以下の範囲内であるものを有効成分とする請求項 1 記載の肝細胞増殖因子産生誘導剤。

【請求項 3】

肝疾患、心疾患、血管疾患、脳疾患、腎疾患、消化器疾患、皮膚疾患、肺疾患、及び神経性の疾患の患者に対して、その疾患を予防または治療するために用いられる、請求項 1 または 2 に記載の肝細胞増殖因子産生誘導剤を含む医薬品組成物。

10

【請求項 4】

肝疾患患者に対して、その疾患を予防または治療するために用いられる、請求項 1 または 2 に記載の肝細胞増殖因子産生誘導剤を含む医薬品組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、天然の植物成分を有効成分とする、肝細胞増殖因子産生誘導剤及びその医薬品組成物としての用途に関するものである。

【背景技術】**【0002】**

肝細胞増殖因子（以下 HGF という）は初代培養肝細胞の増殖を強く促進する因子として精製されたサイトカインであり、肝臓の旺盛な再生力を支える肝再生因子である。HGF は増殖因子としては大きく、分子量 6 万の重鎖と約 3.5 万の軽鎖がジスルフィド結合したヘテロダイマーの構造を持つ。

20

【0003】

HGF は多彩な生理機能を有することが知られている。例えば、特許文献 1、及び非特許文献 1 では、HGF が肝臓、心臓、血管、脳、腎臓、消化器、皮膚、肺、及び神経等種々の組織や器官に対して再生または保護作用を有しており、これらの組織や器官における疾患の改善に有効であることが報告されており、現在、臨床への応用を目指して、閉塞性動脈硬化症患者や劇症肝炎患者等に対して、HGF を外因的に補充し、疾病の治療を試みる取り組みが世界中で盛んに行われている。なかでも肝臓疾患に関しては様々な臨床研究が行われており、劇症肝炎、亜急性肝炎、遅発性肝不全、慢性肝炎、慢性肝疾患の急性増悪、急性肝不全、急性肝炎、胆道閉鎖症、肝硬変、原発性胆汁性肝硬変、肝がん、肝虚血性疾患、肝線維症、脂肪性肝疾患などの患者や、肝部分肝切除処置後または肝移植後の患者など、種々の肝障害患者に対して、HGF タンパク量を増加させることで、対象疾患の進展阻止効果、肝再生促進効果を誘導し、生存率の改善を目指している。

30

【0004】

一方、HGF の有効性に着目し、HGF 産生誘導剤を用いた生体内 HGF 産生誘導試験も行われている。特許文献 2 は、アンジオテンシン変換酵素が、血中の HGF 産生を向上させ、生体の組織や器官等の傷害の治療を促進することを報告している。また、本発明と同様に天然の植物成分を有効成分に着目して、その HGF 産生誘導作用を開示する文献として非特許文献 2 を挙げることができる。当該非特許文献 2 は、ガゴメコンブ由来フコイダンが、HGF 産生誘導作用を有することを開示している。このように、生体での HGF 産生を誘導することによって上述する各種疾患の発症阻止あるいは治療へと繋げることが可能となるため、HGF 産生誘導剤の開発が切望されている。

40

【0005】

また、本発明と同様に冬虫夏草に由来する植物成分に着目し、その薬理機能を開示する文献として特許文献 3 を挙げることができる。特許文献 3 は、冬虫夏草から採取された低分子新規化合物セスキテルペンが、神経細胞の分化誘導活性および/または癌細胞の増殖抑制活性を有することが開示されているが、HGF 産生誘導作用についての言及はない。

50

【特許文献1】特許第3431633号

【特許文献2】特開2001-002587

【特許文献3】特開2003-252876

【非特許文献1】Rubin et al., "Hepatocyte growth factor / scatter factor and its receptor, the c-met proto-oncogene product." Biochem Biophys Acta 1155, 357-371 (1993).

【非特許文献2】酒井ら「コンブフコイダンの機能性と健康食品への利用」, New Food Ind, 43 8-12, (2001).

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0006】

本発明は、天然の植物成分に由来する、HGFの産生を促進するためのHGF産生誘導剤を提供することを目的とする。

【0007】

さらに本発明は、HGF産生誘導作用を有し、肝疾患、心疾患、血管疾患、脳疾患、腎疾患、消化器疾患、皮膚疾患、肺疾患、及び神経性疾患等の患者に対して、これらの疾患の増悪を抑制するために用いられる、植物由来の医薬品組成物を提供することを目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

20

本発明者らは、上記課題を解消すべく、天然の植物として冬虫夏草に着目して、鋭意検討した結果、驚くべきことに、冬虫夏草にHGF産生誘導作用があることを見出し、本発明にいたった。

【0009】

本発明は、次の態様を特徴としている。

項1：冬虫夏草加工処理物を有効成分とする肝細胞増殖因子産生誘導剤。

項2：冬虫夏草から得られる物質であって、その分子量が25,000以上2,000,000以下の範囲内であるものを有効成分とする項1記載の肝細胞増殖因子産生誘導剤。

項3：肝疾患、心疾患、血管疾患、脳疾患、腎疾患、消化器疾患、皮膚疾患、肺疾患、及び神経性の疾患の患者に対して、その疾患を予防または治療するために用いられる、項1または2に記載の肝細胞増殖因子産生誘導剤を含む医薬品組成物。

30

項4：肝疾患患者に対して、その疾患を予防または治療するために用いられる、項1または2に記載の肝細胞増殖因子産生誘導剤を含む医薬品組成物。

【0010】

本発明において、肝疾患の患者としては、劇症肝炎、亜急性肝炎、遅発性肝不全、慢性肝炎、慢性肝疾患の急性増悪、急性肝不全、急性肝炎、胆道閉鎖症、肝硬変、原発性胆汁性肝硬変、肝がん、肝虚血性疾患、肝線維症または脂肪性肝疾患の患者、並びに部分肝切除処置後または肝移植後の患者を挙げることができる。また、心疾患とは心筋梗塞、狭心症、または心筋症を；血管疾患とは閉塞性動脈硬化症、または末梢性血管疾患を；脳疾患とは脳梗塞を；腎疾患とは腎線維化症、腎不全、または慢性糸球体腎炎を；消化器疾患とは胃潰瘍、十二指腸潰瘍、炎症性腸疾患、ベーチェット病、または虚血性腸炎を；皮膚疾患とは皮膚潰瘍を；肺疾患とは肺線維症、または肺高血圧症を；神経性の疾患とは脳神経障害を挙げることができる。

40

【発明の効果】

【0011】

本発明の冬虫夏草加工処理物、例えば冬虫夏草の粉碎物、及び／又は抽出物等を有効成分とするHGF産生誘導剤は、上述する肝臓、心臓、血管、脳、腎臓、消化器、皮膚または肺に疾患を有する患者、及び神経性疾患の患者に対して、これらの疾病の増悪を抑制するため及び／または改善するための、予防剤または治療剤として有効に用いることができる。

50

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

一般に冬虫夏草は、養分を昆虫などから得て寄生生活をし、とりついた昆虫などの体内で、菌糸の固まりである菌核をかたちづくり、やがて虫の体を突き破って生ずるキノコ（子実体）を総称している。冬虫夏草の菌類の分類は、誰もが認める分類体型には至っていないが、慣用的な呼称としてはバツカクキン科（Clavicipitaceae）、冬虫夏草属（Cordyceps）、シネンシストウチュウカソウ（C.sinensis）の一属に位置づけられている。

【0013】

本発明のHGF産生誘導剤の原料として用いられる冬虫夏草は、その種類や原産地を特に制限するものではなく、いずれも使用することができるが、本発明の薬理機能の点から Paecilomyces hepiali Chenが望ましい。

10

【0014】

本発明において冬虫夏草は、採取後加工処理した加工処理物として用いる。加工処理物としては、本発明の薬理機能及び加工容易性から冬虫夏草の粉碎物（生、乾燥物）、任意の溶媒による抽出物を用いることが望ましい。

【0015】

乾燥粉碎物は、冬虫夏草を乾燥した後粉碎するか、または細く切断した後に乾燥することによって調製する。乾燥には、本発明の薬理効果を損なわない範囲であれば特に制限はなく、真空凍結乾燥、熱風乾燥、遠赤外線乾燥、減圧乾燥、マイクロ波減圧乾燥、及び過熱蒸気乾燥等を広く用いることができる。好ましくは、成分変化の少ない真空凍結乾燥である。真空凍結乾燥条件は、原料として用いる冬虫夏草の状態によって異なるので特定できないが、例えば生の冬虫夏草をそのまま乾燥する際、凍結温度は - 30 ~ - 20 、乾燥温度は - 30 ~ 30 、乾燥時間は15時間 ~ 24時間の範囲が望ましい。

20

【0016】

冬虫夏草の抽出物は、生の冬虫夏草をそのまま、もしくは破碎物とした後、抽出操作に供するか、また乾燥後、必要に応じて粉碎し、しかる後抽出操作に供することによって調製することができる。

【0017】

抽出溶媒には、水、エタノールおよびこれらの混合液が安全上望ましいが、抽出溶媒を完全留去して、冬虫夏草抽出物の乾燥粉末として調製する場合には、メタノールやブタノールのごとき低級アルキルアルコール、あるいはアセトン、DMSOのごとき溶媒の使用や種々の溶媒を組み合わせた多段階抽出も可能である。

30

【0018】

得られた抽出物は、必要に応じて、ろ過または遠心分離などの操作により固形物を除去する。次の工程で行われる操作に応じては、抽出物をそのまま用いるか、または溶媒を留去して一部濃縮もしくは乾燥して用いてもよい。また得られた抽出物は、濃縮もしくは乾燥後、さらに適正な溶媒、例えば、非溶解性溶媒で洗浄精製して用いても、またこれを更に適当な溶媒に溶解若しくは懸濁して用いることもできる。さらに本発明においては、例えば、得られた溶媒抽出液を、減圧乾燥、凍結乾燥等の通常的手段に供して、冬虫夏草の乾燥抽出エキスとして使用することもできる。

40

【0019】

このようにして得られる冬虫夏草の加工処理物は、後述の実施例で示すように、HGF産生誘導作用（図1参照）を有している。

【0020】

図1は、実験例1において冬虫夏草加工処理物（抽出物）のヒト皮膚線維芽細胞に対するHGF産生誘導作用を検討した結果を示しており、この結果から冬虫夏草加工処理物にHGF産生誘導作用があることが認められる。このHGF産生誘導作用に基づいて、冬虫夏草加工処理物は、HGFが有効とされる肝疾患、心疾患、血管疾患、脳疾患、腎疾患、消化器疾患、皮膚疾患、肺疾患、及び神経性の疾患の増悪を抑制する作用及び/または改善する作用を有するものと考えられる。

50

【 0 0 2 1 】

よって本発明は、前述する冬虫夏草の加工処理物を有効成分とする H G F 産生誘導剤を提供するものである。H G F 産生誘導剤に含まれる冬虫夏草の加工処理物の割合は、当該 H G F 産生誘導剤が上記 H G F 産生誘導作用を発揮する限り特に制限されず、通常 1 ~ 1 0 0 重量 % の範囲で適宜選択することができる。

【 0 0 2 2 】

また実験例 2 で示すように、かかる冬虫夏草の加工処理物において H G F 産生誘導作用を発揮する物質 (H G F 産生誘導物質) は 2 5 , 0 0 0 以上の分子量をもつ比較的高分子の物質である。このことから、本発明の H G F 産生誘導剤には、上記冬虫夏草から得られる 2 5 , 0 0 0 以上の分子量を有する物質を有効成分とするものも含まれる。なお、当該 H G F 産生誘導物質の分子量の上限は H G F 産生誘導作用を有する限り特に制限されないが、通常 2 , 0 0 0 , 0 0 0 程度を例示することができる。

10

また、本発明の H G F 産生誘導剤の原料である冬虫夏草は、古くから漢方薬として摂取されていることから、安全性が高く長期投与も可能で、医薬組成物の有効成分として有効に利用できるものであると判断される。

【 0 0 2 3 】

ゆえに、本発明の H G F 産生誘導剤は、上記冬虫夏草の加工処理物 (特に粉碎物、もしくは抽出物) を単独で、固体または液体状で利用することもできるが、これに薬学上許容される担体または添加剤を配合して、固体又は液体状の医薬組成物として製剤することもできる。

20

【 0 0 2 4 】

本発明の医薬組成物は、その形態に特に制限はないが、経口に適した形態であることが好ましい。例えば、経口投与用固体組成物 (固形医薬製剤) としては、錠剤 (糖衣錠を含む) 、丸剤、カプセル剤、細粒剤、顆粒剤等の形態を、また経口投与用液状組成物 (液状医薬製剤) としては、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤などの形態をとることができる。これらの製剤には、有効成分に加えて、剤形に応じて、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色料、矯味矯臭剤、p H 調整剤等を適宜配合、常法に従って調製することができる。

【 0 0 2 5 】

また本発明の医薬組成物には、有効成分である冬虫夏草加工処理物、及び前記担体または添加剤に加えて、ビタミン等の他の機能性成分が含まれていてもよい。医薬組成物の有効成分の組成比は、使用目的等によって異なるので特定はできないが、後述の有効投与量を基準値として、適宜調整可能である。

30

【 0 0 2 6 】

本発明の医薬組成物の有効投与量は、投与方法、投与期間、患者の病態、年齢、性別、投与目的、その他の条件に応じて広範囲から選択できる。例えば、本発明の医薬組成物を肝疾患、心疾患、血管疾患、脳疾患、腎疾患、消化器疾患、皮膚疾患、肺疾患、及び神経性の疾患の予防または治療剤として用いる場合の体重 60 kg のヒトに対する 1 回投与あたりの量として、冬虫夏草の乾燥重量に換算して約 2 4 ~ 4 8 0 g 、好ましくは約 2 4 0 ~ 4 8 0 g の範囲を挙げることができる。

40

【 0 0 2 7 】

本発明の医薬組成物の投与時期及び期間は、有効成分が植物起源の安全で副作用の少ない冬虫夏草であることから特に制限はない。

【 0 0 2 8 】

本発明の医薬組成物を投与する対象の上記疾患の患者は、本発明がその患者の症状や病態の改善に奏効し、その効果を有効に享受できる哺乳類 (好ましくはヒト) であれば特に制限されない。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 2 9 】

本発明の冬虫夏草加工処理物を有効成分とする HGF 産生誘導剤は、肝臓、腎臓、肺、心

50

・血管系、神経系などを含む様々な組織や臓器の再生または保護作用を有しており、前述する臓器に疾患を有する患者に対する疾患予防剤または治療剤として広く利用することができる。具体的には、肝疾患（例えば慢性肝炎、肝硬変、劇症肝炎）の患者に対して、その疾患を予防または治療するための医薬品として利用することができる。

【実施例】

【0030】

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明する。但し、本発明はこれらの実施例によって制限されるものではない。なお、実施例中、「%」は特に言及しないかぎり、「V/V%」を意味する。

【0031】

1. 調製例

調製例 1：冬虫夏草凍結乾燥粉末の調製

山東智靈生物工程有限会社（中国済南市）にて低温培養された冬虫夏草の菌系体（*Paecilomyces hepiali* Chen）を、同会社にて凍結乾燥処理して粉末物として調製した。同会社の説明によれば、本品凍結乾燥粉末の成分は天然冬虫夏草のそれとほぼ一致する。

【0032】

調製例 2：冬虫夏草抽出液の調製

調製例 1 で調製した冬虫夏草乾燥粉末を 10 倍量（w/v）のリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）に懸濁し、40℃で 1.5 時間かけて攪拌・抽出した後、16,000 xg、4℃で、20 分間遠心分離し、上清を得た。一方、沈殿物をさらに当初の重量の 5 倍量（w/v）の PBS に懸濁し、ポリトロンホモジナイザー（KINEMATICA AG）によりホモジナイズ（15000 回転/分、60 秒）した。これを先と同様に 40℃で 1.5 時間かけて攪拌・抽出し、遠心分離して得られた上清を先の上清に合わせ、冬虫夏草抽出液として以下の実験に用いた（実験例 1）。実験に用いるまでは -80℃で保存した。

【0033】

調製例 3：ゲルろ過クロマトグラフィーによる分画物の調製

PBS で十分に膨潤させた Sephadex G-50（GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社）をカラムに充填し、PBS で平衡化した。これに、調製例 2 に従って調製した冬虫夏草抽出液 2 ml を供し、PBS で溶出しながらフラクションを 1 ml ずつ回収した。回収したフラクション（ゲルろ過分画物）を下記に示す実験に用いた（実験例 2 参照）。なお、分子量マーカーとしてブルーデキストラン（M.W.2000000）、炭酸脱水酵素（M.W.29000）、ミオグロビン（M.W.17000）、およびサイトクロム c（M.W.12327）を用いた。これらは、PBS で十分に洗浄した充填カラムにそれぞれ供して PBS で溶出し、280 nm の吸光度から溶出ピーク位置を決定した。

【0034】

調製例 4：トリプシン処理物の調製

調製例 2 に従って調製した冬虫夏草抽出液を、2.84 倍容量の PBS 及び 0.16 倍容量の 0.25% トリプシン溶液（ナカライテスク株式会社）と共に 37℃で 30 分間インキュベートした後、1 倍容量の牛胎児血清（FCS、Sigma 社）を添加して酵素反応を停止させた。このようにして調製した冬虫夏草抽出液を下記に示す実験に使用した（実験例 3 参照）。

【0035】

2. 実験操作

後述する実験例で使用した実験操作を説明する。

【0036】

実験操作 1：ヒト皮膚線維芽細胞培養法

ヒト皮膚線維芽細胞（Cell Systems 社）の培養は、37℃、95% 空気と 5% CO₂ の気相下、10% 牛胎児血清（FCS、Sigma 社）、100 U/ml のペニシリン G（和光純薬工業株式会社）及び 100 mg/ml のストレプトマイシン（和光純薬工業株式会社）を含むダルベッコ変法イーグル培地（DMEM、日水製薬株式会社）（DMEM-10）中で行った。ヒト皮膚線維芽細胞を、組織培養フラスコ（25 cm²、Nunc 社）内でコンフルエントにまで培養した（7 日間）後、0.25%

10

20

30

40

50

トリプシン溶液（ナカライテスク株式会社）をPBSで2倍希釈したものを用いて細胞を剥離し、一部を継代した。残りの細胞を96穴平底マルチプレート（Nunc社）に 1.8×10^4 cells/cm² (0.17 ml/well) の密度で播き、4日後に培地交換を行い、十分コンフルエントになるまで培養した（約8日間）後、実験に供した。実験には継代7～10代目の細胞を用いた。

【0037】

実験操作2：試薬添加、培養上清回収方法

96穴平底マルチプレート内のヒト皮膚線維芽細胞がコンフルエントに達した（約8日間）後、培地交換と同時に調製例2で調製した冬虫夏草抽出液、3-isobutyl-1-methylxanthine（以下「IBMX」という、Sigma社）、又は溶媒を添加した（ $n = 3$ ）。冬虫夏草抽出液又は溶媒と共に、5日間培養した後、培養上清を遠心（4、3000 rpm、5 min）し、その上清120 mlを、HGFレベルの測定まで-30℃で保存した。

10

【0038】

実験操作3：培養上清中のHGFレベルの測定方法

培養上清中のHGFレベルは坪内らによって開発されたHGF ELISA (Tsubouchi H., et al., "Levels of the human hepatocyte growth factor in serum of patients with various liver diseases determined by an enzyme-linked immunosorbent assay" *Hepatology*, 13, 1-5 (1991)) に準じた方法により測定した。まず、0.075% ProClin-300 (Spelco社) 含有PBSで希釈した抗ヒトHGFモノクローナル抗体 (R&D Systems社、1.2 mg/ml) を96穴プレート (Nunc社、No. 439454) に添加 (100 ml) 後、密封し室温で一晩静置した。プレートを洗浄液 (0.05% Tween 20を含むPBS) で4回洗浄し、1.5% ウシ血清アルブミン (BSA) 含有PBS (300 ml) を添加した後、室温で1時間半静置しブロッキングを行った。再び洗浄液で6回洗浄し、0.01 Mリン酸緩衝液 (pH 7.4、0.2% BSA、2M NaCl、0.2% CHAPS、0.1% Tween 20、1% マウス血清、30% ヤギ血清及び、0.075% ProClin-300を含む) を50 ml、0.12 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を10 ml 及びHGF標準液あるいは培養上清を40 ml 添加してよく混合した後、室温で2時間静置した。洗浄液で6回洗浄し、ビオチン化抗ヒトHGFモノクローナル抗体 (R&D Systems社、1% BSA及び0.05% Tween 20を含むPBSで170 ng/mlに希釈したもの) を100 ml 添加し、室温で2時間静置した。その後洗浄液で6回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識ストレプトアビジン (Zymed社、1% BSA及び0.05% Tween 20を含むPBSで6000倍希釈したもの) を100 ml 添加し、室温で25分静置した。洗浄液で6回洗浄し、発色基質として100 mlのオルトフェニレンジアミン溶液 (Sigma社のP9187製品 1錠を22 mlの蒸留水に溶解したもの) を加え、室温で15～30分間静置した。1 N硫酸を100 ml加えて反応を停止した後、490 nmの吸光度をプレートリーダー (Bio-Rad社) にて測定した。標準曲線の両対数変換2次回帰直線から培養上清中のHGFレベルを ng/mlとして求めた。

20

30

【0039】

3. 実験例

実験例1：冬虫夏草抽出物がHGF産生に及ぼす影響

上述実験操作1に従って培養したヒト皮膚線維芽細胞及び、調製例2で調製した冬虫夏草抽出物を用い、冬虫夏草抽出物がHGF産生に及ぼす影響について検討した。実験は、前述する実験操作2及び3の方法に従って行った。結果を図1に示す。なお、結果は実験を行った冬虫夏草抽出物の3回の実験結果の平均値と標準誤差で表わした。

40

【0040】

図1に示すように、冬虫夏草抽出物は濃度依存的に顕著なHGF産生を誘導した。そのHGF産生誘導作用はポジティブコントロールとして用いたIBMX (50 mM) の作用よりも強かった。

【0041】

図1の結果から、冬虫夏草抽出物が、ヒト皮膚線維芽細胞のHGF産生を強く促進することが明らかとなった。

【0042】

50

実験例 2 . 冬虫夏草抽出物のゲルろ過分画物が HGF 産生に及ぼす影響

上述実験操作 1 に従って培養したヒト皮膚線維芽細胞及び、調製例 3 で調製した冬虫夏草抽出物の各ゲルろ過分画物を用いて実験操作 2 および 3 を行い、冬虫夏草抽出物のゲルろ過分画物が HGF 産生に及ぼす影響について検討した。結果を図 2 に示す。結果は各分画物について HGF ELISA の測定結果 (n=3) の結果の平均値と標準偏差で表わした。

【 0 0 4 3 】

図 2 に示すように、HGF 産生誘導活性は分画フラクション No. 17 ~ 24 の範囲に強く認められた。なお、分子量マーカーであるブルーデキストラン (分子量 2,000,000) はフラクション No. 21 に、また炭酸脱水酵素 (分子量 29,000) はフラクション No. 24 に溶出された。

10

【 0 0 4 4 】

このことから、冬虫夏草抽出物中に存在する HGF 産生誘導物質は 25,000 以上の分子量をもつ比較的高分子の物質であると考えられた。

【 0 0 4 5 】

実験例 3 . 冬虫夏草抽出物のトリプシン処理物が HGF 産生に及ぼす影響

上述実験操作 1 に従って培養したヒト皮膚線維芽細胞、及び調製例 4 で調製した冬虫夏草抽出物のトリプシン処理物を用いて実験操作 2 および 3 を行い、当該トリプシン処理物が HGF 産生に及ぼす影響について検討した。なお、実験において、冬虫夏草抽出物のトリプシン処理物は当初の冬虫夏草抽出液に換算して 5 % の濃度に調整し、これをヒト皮膚線維芽細胞に添加して HGF 産生誘導活性を測定した。

20

【 0 0 4 6 】

結果を図 3 に示す。結果は各トリプシン処理物について HGF ELISA の測定結果 (n=3) の結果の平均値と標準偏差で表わした。

【 0 0 4 7 】

図 3 に示すように、0.01% (w/v) トリプシン処理は、冬虫夏草抽出物が有する HGF 産生誘導作用に影響を与えなかった。このことから、冬虫夏草抽出物中の HGF 産生誘導物質は、トリプシン処理によってその活性が失活しない物質、例えばタンパク質以外の物質であることが明らかとなった。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 8 】

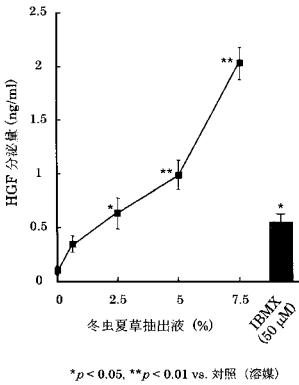
30

【図 1】実験例 1 で検討した冬虫夏草抽出物の HGF 産生誘導効果を示すグラフである。

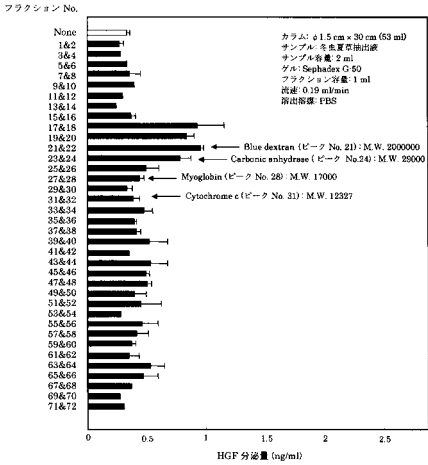
【図 2】実験例 2 で検討した冬虫夏草抽出物のゲルろ過分画物の HGF 産生誘導効果を示すグラフである。

【図 3】実験例 3 で検討した冬虫夏草抽出物トリプシン処理物の HGF 産生誘導効果を示すグラフである。

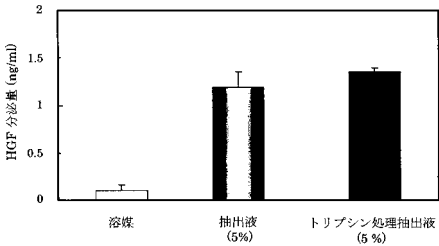
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 9/14 (2006.01)	A 6 1 P 9/14	

(72)発明者 坪内 博仁
鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘 8 - 3 5 - 1 国立大学法人鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科内

(72)発明者 合田 榮一
岡山県岡山市津島中 1 - 1 - 1 国立大学法人岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科内

(72)発明者 奥山 淳祥
岡山県岡山市津島中 1 - 1 - 1 国立大学法人岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科内

(72)発明者 鐘 鳴
岡山県岡山市津島中 1 - 1 - 1 国立大学法人岡山大学薬学部内

F ターム(参考) 4C088 AA02 BA10 CA06 CA14 NA14 ZA02 ZA36 ZA75 ZA81