(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
2023年5月11日(11.05.2023)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2023/079954 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 31/4172 (2006.01) *A61K 36/06* (2006.01)
A23L 33/10 (2016.01) *A61K 47/40* (2006.01)
A23L 33/14 (2016.01) *A61P 27/16* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/038850

(22) 国際出願日： 2022年10月19日(19.10.2022)

(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 2021-181678 2021年11月8日(08.11.2021) JP

(71) 出願人: 三菱瓦斯化学株式会社(**MITSUBISHI GAS CHEMICAL COMPANY, INC.**) [JP/JP]; 〒1008324 東京都千代田区丸の内二丁目５番２号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 樋田 匠(**TOIDA, Takumi**); 〒9503112 新潟県新潟市北区太夫浜新割１８２番地 三菱瓦斯化学株式会社 新潟研究所内 Niigata (JP). 蛯山 眞與(**GAYAMA, Shinyo**); 〒9503112 新潟県新潟市北区太夫浜新割１８２番地 三菱瓦斯化学株式会社 新潟研究所内 Niigata (JP).

(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外(**INABA, Yoshiyuki** et al.); 〒1066123 東京都港区六本木６－１０－１ 六本木ヒルズ森タワー２３階 ＴＭＩ総合法律事務所 Tokyo (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, 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, ME, 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)）

WO 2023/079954 A1

(54) **Title:** ERGOTHIONEINE-CONTAINING COMPOSITION FOR SUPPRESSING OR PREVENTING INNER EAR HEARING LOSS

(54) 発明の名称： 内耳性難聴の抑制又は予防のためのエルゴチオネインを含む組成物

(57) **Abstract:** The present invention provides a composition for suppressing or preventing inner ear hearing loss, the composition containing ergothioneine or a salt thereof.

(57) 要約: 本発明は、内耳性難聴の抑制又は予防のための組成物であって、エルゴチオネイン又はその塩を含む、組成物等、を提供する。

明　細　書

発明の名称 ：

内耳性難聴の抑制又は予防のためのエルゴチオネインを含む組成物

技術分野

[0001]　本発明は、エルゴチオネインの新規用途、特に、内耳性難聴の抑制又は予防のための使用等に関する。

背景技術

[0002]　アミノ酸の一種であるエルゴチオネインは高い抗酸化作用を有することが知られているが、人間の体内で合成できない物質であるため、エルゴチオネインを配合した化粧品、食品、医薬、飼料等への開発が期待されている。しかしながら、エルゴチオネインが人間の体内で果たす機能は解明されていない。

[0003]　エルゴチオネインの抗酸化作用はグルタチオン等の他の抗酸化物質よりも優れていることが報告されているが、あらゆる抗酸化物質が体内の酸化に起因する疾患の治療乃至予防に役立つわけではなく、その効能、効果又は医薬用途を見出すためには個別の検討が必要となる。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特許第５４２１３６６号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005]　難聴の多くは耳を構成する外耳、中耳、内耳のうちのいずれかに障害があることが多く、その部位により伝音難聴（外耳、中耳）と感音難聴（内耳）の２つに大きく分類される。これらの難聴は更に原因により細分類されるが、感音難聴の一つとして加齢性難聴が知られている。

[0006]　加齢性難聴は、文字通り加齢に伴い進行する難聴であり、その根本的な治療方法は存在しない。

[0007] 特許第５４２１３６６号公報では、耳への鼓室内投与によって耳の疾患の処置の際に使用するための無菌の医薬組成物であって、前記医薬組成物は、ポリオキシプロピレンとポリオキシエチレンのコポリマーを含む耳に許容可能な熱可逆性の水性ゲルと、耳への徐放が少なくとも３日間起こるような耳の構造体変性剤とを含み、前記耳の構造体変性剤が骨再構築のモジュレーターであることを特徴とする医薬組成物、が開示されている（請求項１等）。

[0008] 同公報は上記組成物の対象疾患として種々の疾患を挙げており、その中に難聴加齢性難聴も含まれているが、実際に上記医薬組成物が加齢性難聴等の内耳性難聴の予防等に有効であることを確認した試験は行われていない。

[0009] 難聴の原因は様々であり、ある難聴の予防に有効である物質が必ずしもそれ以外の難聴に有効であるかは不明である。

発明を解決するための手段

[0010] 驚くべきことに、本発明者らは、エルゴチオネインが加齢性難聴等の内耳性難聴の予防等に有効であることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0011] 即ち、本願は以下の発明を包含する。

［１］

内耳性難聴の抑制又は予防のための組成物であって、エルゴチオネインを含む、組成物。

［２］

エルゴチオネインが一日当り０．０１ｍｇ／ｋｇ体重以上、１００ｍｇ／ｋｇ体重未満の範囲の量で投与される、［１］に記載の組成物。

［３］

一日一回又は複数回投与される、［２］に記載の組成物。

［４］

投与期間が少なくとも一週間以上である、［２］又は［３］に記載の組成物。

［５］

投与が経口投与を含む、［２］～［４］のいずれかに記載の組成物。

［６］

内耳性難聴が加齢性難聴である、［１］～［５］のいずれかに記載の組成物。

［７］

内耳性難聴が薬剤誘導性難聴ではない、［１］～［６］のいずれかに記載の組成物。

［８］

エルゴチオネインを投与される対象が、聴性脳幹反応（ＡＢＲ）により加齢性難聴と診断されている、［１］～［７］のいずれかに記載の組成物。

［９］

エルゴチオネインが酵母由来である、［１］～［８］のいずれかに記載の組成物。

［１０］

酵母が、ロドトルラ（Ｒｈｏｄｏｔｏｒｕｌａ）属の不完全酵母である、［９］に記載の組成物。

［１１］

酵母抽出物を更に含む、［８］又は［９］に記載の組成物。

［１２］

エルゴチオネインが酵母抽出物に含まれている、［１１］に記載の組成物。

［１３］

酵母抽出物にエルゴチオネインが固形分中濃度として０．１～２０％含まれている、［１２］に記載の組成物。

［１４］

酵母抽出物が粉末である、［１１］～［１３］のいずれかに記載の組成物。

［１５］

シクロデキストリンを更に含む、［１］～［１４］のいずれかに記載の組

成物。

［１６］

組成物が医薬、食品又はサプリメントの形態である、［１］～［１５］のいずれかに記載の組成物。

［１７］

エルゴチオネインが一日当り一回０．１ｍｇ以上、１０００ｍｇ未満の範囲の量で投与される、［１６］に記載の組成物。

［１８］

対象における内耳性難聴の抑制又は予防のための方法であって、エルゴチオネインを対象に投与することを含む、方法。

［１９］

一日一回又は複数回投与される、［１８］に記載の方法。

［２０］

投与期間が少なくとも一週間以上である、［１８］又は［１９］に記載の方法。

［２１］

投与が経口投与を含む、［１８］～［２０］のいずれかに記載の方法。

本発明の効果

[0012] エルゴチオネインはヒトの体内での安全性が確認されているため、本発明により、サプリメント等にエルゴチオネインを配合して内耳性難聴を予防することが期待される。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明の実施の形態（以下、「本実施形態」という。）について説明するが、本発明の範囲は以下の実施形態に限定して解釈されない。

[0014] （組成物）

第一の態様において、内耳性難聴の抑制又は予防のための組成物であって、エルゴチオネイン又はその塩を含む、組成物、が提供される。

[0015] 内耳性難聴の原因として先天性又は後天性のものがある。老人性難聴とし

ても知られる加齢性難聴は後天性の内耳性難聴であり、感音性難聴に分類される。内耳性難聴の場合、加齢性難聴であることが好ましい。エルゴチオネインは、可聴領域の低周波領域（例えばマウスの場合１～４０ｋＨｚ、ヒトの場合２～２０ｋＨｚ）、好ましくは可聴領域の低周波領域側から０％～９０％の周波数帯域（例えばマウスの場合１～３６．１ｋＨｚ、ヒトの場合２～１８．２ｋＨｚ）、より好ましくは０％～７０％の周波数帯域（例えばマウスの場合１～２８．３ｋＨｚ、ヒトの場合２～１４．６ｋＨｚ）での難聴抑制効果を有する。なお、本明細書で使用する場合、「可聴領域の低周波領域側から０％～９０％の周波数帯域」は、[下限周波数]＋（[上限周波数]－[下限周波数]）に該当の百分率を割合で掛けた値であり、例えば、下限周波数が１ｋＨｚで、上限周波数が４０ｋＨｚの場合、５０％の周波数は、２０．５となる（１＋（４０－１）×０．５）。

[0016] その他の後天性の内耳性難聴の原因として、遺伝性疾患（例、コネキシン26遺伝子変異、ワールデンブルグ症候群、Usher症候群、ペンドレッド症候群）、騒音曝露、聴器毒性のある薬剤（例、アスピリン、アミノグリコシド系薬剤、バンコマイシン、シスプラチン、フロセミド、エタクリン酸、キニーネ）、感染症（例、髄膜炎、化膿性内耳炎）、自己免疫疾患（例、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス）、メニエール症候群、気圧外傷（外リンパ瘻を伴う）、頭部外傷（頭蓋底の骨折または蝸牛の振盪を伴う）、Auditory neuropathy（聴覚神経障害）に起因するものが知られている。これらの後天性内耳性難聴、特に薬剤により誘導される難聴と加齢性難聴は明確に区別される。

[0017] 先天性の内耳性難聴として、遺伝性、特発性（原因不明の）奇形、先天性感染症（例、風疹、サイトメガロウイルス感染症、トキソプラズマ症、梅毒）、Ｒｈ式血液型不適合、無酸素症、聴器毒性のある薬剤の母体摂取（例、結核や重度の感染症に対するもの）、薬剤性奇形（例、サリドマイドによるもの）に起因するものがある。

[0018] 有効成分であるエルゴチオネインは含硫アミノ酸の一種である。エルゴチ

オネインを有効量含む組成物を摂取することで内耳性難聴の抑制、予防又は治療が達成される。エルゴチオネインはＬ体であることが好ましい。

[0019] エルゴチオネインは塩の形態であってもよい。塩は薬学的に許容可能なものである限りその種類は特に限定されず、塩酸、リン酸、硫酸、硝酸、ホウ酸等との塩（無機酸塩）や、ギ酸、酢酸、乳酸、フマル酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸等との塩（有機酸塩）をその例として挙げることができる。本明細書で使用する「エルゴチオネイン」は、特に断らない限り、その薬学的に許容可能な塩も含み得る。

[0020] エルゴチオネインは市販のものを使用してもよいし、合成してもよい。エルゴチオネインの製造方法として、例えば化学合成法、エルゴチオネインを産生する菌類（ササクレヒトヨタケ、ヒラタケ、タモギタケ、エノキタケ、エリンギ、シイタケ等のきのこ類を含む）を培養後、エルゴチオネインを抽出精製する方法、発酵法、エルゴチオネインを含有する動物血液等から抽出する方法等が挙げられる。

[0021] エルゴチオネインを産生する菌の例として酵母が挙げられる。本明細書で使用する場合、「酵母」とは、培養条件下でエルゴチオネインを産生し得るものであれば特に限定されない。本明細書における酵母は出芽酵母が好ましく、不完全酵母類であることがより好ましい。

[0022] 不完全酵母の例としてロドトルラ（Ｒｈｏｄｏｔｏｒｕｌａ）属、クリプトコッカス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）属などの酵母が挙げられ、これらの中でもロドトルラ属が好ましい。ロドトルラ属の酵母にはロドトルラ・ムシラギノーサ（Ｒｈｏｄｏｔｏｒｕｌａ　ｍｕｃｉｌａｇｉｎｏｓａ）、ロドトルラ・グルチニス（Ｒｈｏｄｏｔｏｒｕｌａ　ｇｌｕｔｉｎｉｓ）等が含まれる。

[0023] エルゴチオネインは、酵母等の菌に由来する場合、菌体に含まれた状態で組成物に配合されてもよいし、菌から抽出した後に、抽出物として組成物に配合されてもよい。エルゴチオネインは菌体中又は抽出物中に任意の濃度で含まれる。例えば、抽出物はエルゴチオネインを固形分中濃度として０．１

～２０％含んでもよい。エルゴチオネインは所望とする純度に応じて適宜精製され得る。精製方法は公知の方法を使用することができ、例えば順相カラム、逆相カラム、イオン交換カラム等を用いるカラムクロマトグラフィー、結晶化、膜処理、活性炭処理等を適宜組み合わせて行うことができる。

[0024] 組成物は、菌体の状態でもよいし、あるいは、他の成分と組み合わせて医薬、食品又はサプリメントの形態で存在してもよい。食品の例として特定保健用食品、機能性表示食品又は栄養機能食品が挙げられる。組成物は、有効成分としてのエルゴチオネインの効果を損なわない範囲で、内耳性難聴の抑制又は予防のための追加の成分や、通常用いられる担体、例えば賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、緩衝剤、結合剤、乳化剤、懸濁剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水等を含んでもよい。安定剤の例としてシクロデキストリンが挙げられる。シクロデキストリンは、α-シクロデキストリン、β-シクロデキストリン、γ-シクロデキストリン又はそれらの組み合わせを使用することができるが、内耳性難聴の抑制又は予防の効果を増大させる観点からはγ-シクロデキストリンが好ましい。エルゴチオネインが菌に由来する場合、組成物は菌体又はその抽出物を含んでもよいし、精製後のエルゴチオネインを含むこともできる。菌の抽出物は粉末状であってもよい。

[0025] 組成物が投与される対象はヒトに限定されず、非ヒト動物、例えばマウスであってもよい。組成物は、内耳性難聴を将来発症することが予想される対象、既に発症している対象、例えば内耳性難聴に罹患していると診断された対象に投与される。内耳性難聴の診断方法は特に限定されないが、加齢性難聴の診断方法として聴性脳幹反応（ＡＢＲ）が挙げられる。

[0026] 組成物におけるエルゴチオネインの量は組成物が投与されるヒトの症状、年齢、性別、投与頻度等により適宜変更されるが、一日当り０．０１ｍｇ／ｋｇ体重以上、１００ｍｇ／ｋｇ体重未満の範囲で適宜調整され得る。ヒトの場合、一日当たり０．１ｍｇ～１０００ｍｇ程度となるようにエルゴチオネインを投与することが好ましく、０．２～８００ｍｇ程度となるようにエルゴチオネインを投与することがより好ましく、０．５～５００ｍｇ程度と

なるようにエルゴチオネインを投与することがとくに好ましい。

[0027] 投与期間や投与回数は対象の症状や投与量によって変動するが、少なくとも１週間以上、好ましくは１０週間以上、例えば１３週以上、一日一回投与することが好ましい。３２ｋＨｚ程度の高周波数帯域での難聴には、長期間の治療、例えば１３週間以上の治療を行うことで難聴抑制効果が増大し得る。

[0028] 組成物の剤型としては錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、注射剤、外用剤、座剤等が挙げられる。

[0029] 賦形剤としては乳糖、デンプン、ソルビトール、Ｄ－マンニトール等を用いることができる。崩壊剤としてはデンプン、カルボキシメチルセルロース、炭酸カルシウム等を用いることができる。緩衝剤としてはリン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。乳化剤としてはアラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、トラガント等を用いることができる。結合剤としては、プルラン、アラビアゴム、ゼラチン、デンプン等を用いることができる。滑沢剤としてはステアリン酸マグネシウム、メチルセルロース、ケイ酸マグネシウムを用いることができる。懸濁剤としてはモノステアリン酸グリセリン、モノステアリン酸アルミニウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム等を用いることができる。安定剤としてはプロピレングリコール、ジエチリン亜硫酸塩、アスコルビン酸等を用いることができる。保存剤としてはフェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等を用いることができる。防腐剤としては塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等を用いることができる。

[0030] 組成物の投与形態は内耳性難聴の抑制又は予防が可能な限り特に限定されず、例えば、経口投与、又は静脈内、腹腔内、皮下若しくは経皮等の非経口投与などを挙げることができる。

[0031] （方法）

第二の態様において、対象における内耳性難聴の抑制又は予防のための方

法であって、エルゴチオネイン又はその塩を対象に投与することを含む、方法、が提供される。

[0032] エルゴチオネインが投与される対象は内耳性難聴の抑制又は予防の必要性がある者である。対象はヒトに限定されず、非ヒト動物、例えばマウスであってもよい。

[0033] エルゴチオネインは、内耳性難聴の抑制又は予防に効果が知られている他の成分と組み合わせて投与することができ、それぞれの投与は同時でもよいし、異なるタイミングでもよい。

[0034] エルゴチオネインの剤型、投与量、投与経路等は上述したとおりである。

[0035] 以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

[0036] 実施例１：

１．材料及び方法

１．１．エルゴチオネイン及び媒体

１．１．１．エルゴチオネインを含む酵母抽出粉末の製造

ロドトルラ・ムシラギノーサ（Ｒｈｏｄｏｔｏｒｕｌａ　ｍｕｃｉｌａｇｉｎｏｓａ）酵母を液体培地中で培養した培養液から、遠心処理（１２，０００×ｇ、９０分）により菌体を回収した。得られた菌体を水で洗浄後、遠心処理（１２，０００×ｇ、９０分）を２回繰り返した。菌体に水を加え、９５℃で１０分間処理し、菌体内のエルゴチオネインを抽出した。その後、遠心処理（１２，０００×ｇ、９０分）により抽出液を得、ＵＦ膜（分画分子量：６ｋＤａ、２５℃）処理により、粗精製液を得た。粗精製液をエバポレーターで濃縮後、８０℃で３０分間の加熱殺菌処理を行った。殺菌処理後の粗精製液を噴霧乾燥することにより、酵母抽出物の粉末を得た。

[0037] 本実施例では、Ａｓａｈｉｐａｋ　ＮＨ２Ｐ－５０カラムを用いたＨＰＬＣでエルゴチオネイン含有量を測定した。溶出液Ａ（０．１ 容量%トリエチルアミン、５０ ｍＭリン酸ナトリウムバッファー：ｐＨ ７．３）及び溶出

液Ｂ（１００ ｍＭ ＮａＣｌ）の濃度勾配液を用いてエルゴチオネインを溶出した。波長２５４ｎｍの吸光度で測定し、約５．７分にエルゴチオネインの溶出が認められた。酵母抽出物１０μｇ/ｍｌ濃度水溶液を０．２μｍフィルターで膜ろ過し、ろ過物についてＨＰＬＣ測定を行い、エルゴチオネイン７５ｍｇ／ｇを含有することを確認した。

[0038] １．１．２．媒体

注射用水（株式会社大塚製薬製）

[0039] １．２．麻酔薬

以下の試薬の必要量を混合して使用した。

・ケタミン塩酸塩（ケタラール（登録商標）筋注用５００ｍｇ、第一三共プロファーマ株式会社）

・キシラジン塩酸塩（セラクタール（登録商標）２％注射液、バイエル薬品株式会社）

[0040] １．３．投与検体

１．３．１．調製法

１．３．１．１．エルゴチオネインを含む酵母抽出粉末の調製

酵母抽出粉末を９０ｍｇ秤量後、注射用水を用いて溶解し、酵母抽出粉末の濃度が３０ｍｇ／ｍＬとなるように調製した。用事調製とした。

[0041] １．４．１．２．混合麻酔薬

ケタラール（登録商標）筋注用５００ｍｇを１．５ｍＬ、セラクタール（登録商標）２％注射液を０．５ｍＬの配合比で用時に分取し、混合して使用した。

[0042] ２．試験系

２．１．動物種、系統

加齢性難聴モデルで一般的に用いられる動物種で、その系統維持が確立されている動物種である以下のマウス（ＳＰＦ）系統を使用した。

Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ（日本チャールズ・リバー株式会社）

[0043] ２．２．動物の性別、月齢及び入手匹数

雄、１０週齢、２０匹

[0044] ２．２．予備飼育

入手後、１４日間の予備飼育期間を設けた。この間に体重測定を３回、ＡＢＲ検査を１回、一般状態の観察を１日１回行い、体重推移、ＡＢＲ検査及び一般状態に異常が認められない動物を群分けに使用した。

[0045] ２．３．群分け

予備飼育期間中のＡＢＲ検査において２４及び３２ｋＨｚの音圧閾値が高い動物３例（４例以上見られた場合は除外しない）を除外し、コンピュータプログラム（ＩＢＵＫＩ、株式会社日本バイオリサーチセンター）を用いて、体重を層別に分けた後、無作為抽出法により、各群の体重の分散がほぼ等しくなるように群分けした。

[0046] ２．４．環境条件及び飼育管理

管理温度：１８～２８°Ｃ、管理湿度：３０～８０％ＲＨ、明暗各１２時間（照明：６時～１８時）、換気回数：１２回／時（フィルターを通した新鮮空気）に維持された飼育室で動物を飼育した。

[0047] ３．投与

３．１．投与経路、投与方法、投与時刻、投与液量、投与期間及び投与回数

投与経路：経口

投与方法：ディスポーザブルマウス用経口ゾンデ（有限会社フチガミ器械）を取り付けたポリプロピレン製ディスポーザブル注射筒（テルモ株式会社）を用いて経口投与した。投与時はマグネティックスターラーを用いて撹拌し、注射筒に吸引後、経口ゾンデに付着した投与検体を拭き取った。

投与時刻：８時３０分から１１時００分に投与した。

投与液量：投与日に最も近い体重を基準として１０ｍＬ／ｋｇで算出した。

投与期間：１３週間（９１日間）。

投与回数：１日１回。

[0048] ４．群構成

試験群は以下に示す２群とした。各群の動物数は８匹とした。

[表1]

群番号	群名称	投与量 (mg/kg)	動物数
1	コントロール	0 a)	8
2	酵母抽出粉末	３００	8

ａ）媒体を１０ｍＬ／ｋｇ投与した。

[0049] 各群の動物番号の末尾１～４の個体を第１クールに、５～８の個体を第２クールに割り付けた。

[0050] ５．観察及び検査

５．１．一般状態の観察

毎日午前中（投与後およそ１時間を目安）に１回行った。

[0051] ５．２．体重測定

投与１日（初回投与日を１日と起算）、その後２週間に１回及びＡＢＲ検査日の一般状態の観察時に測定した。

[0052] ５．３．ＡＢＲ（聴性脳幹反応）検査

ＡＢＲ検査は、投与前（１１週齢）及び最終投与日の翌日（２５週齢）に行った。動物に、２７Ｇ　注射針（テルモ株式会社）を取り付けたポリプロピレン製ディスポーザブル注射筒（テルモ株式会社）を用いて、混合麻酔薬［ケタミン塩酸塩（７５ｍｇ／ｋｇ）とキシラジン塩酸塩（１０ｍｇ／ｋｇ）］を皮下投与（投与液量：２ｍＬ／ｋｇ）した。麻酔後、関電極を検耳（右耳）の外耳付近の皮下、不関電極を頭頂部皮下、アース電極を頸背部皮下にそれぞれ装着した。電極からＡＢＲの電位を生体電位アンプ（Ｍｏｄｅｌ：ＥＲ－１、Ｃｙｇｎｕｓ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｃ．）に誘導し、データ収録・解析システム（ＰｏｗｅｒＬａｂ、Ｓａｍｐｌｉｎｇ　ｓｏｆｔ：ＬａｂＣｈａｒｔ　ｖｅｒ．８、ＡＤＩｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）に記録した（記録条件：Ｓａｍｐｌｉｎｇ　ｔｉｍｅ：１０ｍｓ、Ｓａｍｐｌｉｎｇ　ｒａｔｅ：４０ｋＨｚ、Ｂａｎｄｐａｓｓ　ｆｉｌｔｅｒ：１－３０００Ｈｚ、加算回数　５００回）。

[0053] 音刺激は、Ｃｏｕｐｌｅｒ　ｔｙｐｅ　ｓｐｅａｋｅｒ（Ｍｏｄｅｌ：Ｅ

Ｓ１ｓｐｃ、バイオリサーチセンター株式会社）を右外耳道に挿入し、ＴＤＴ音響システム（ＺＢｕｓ　ｆｏｒ　ｓｙｓｔｅｍ３、Ｔｕｃｋｅｒ－Ｄａｖｉｓ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｉｎｃ．）より与えた（音圧範囲：１０－９０ｄＢ、音の種類：２４及び３２ｋＨｚのＴｏｎｅ　ｂｕｒｓｔ）。最初に９０ｄＢの音刺激を与えてＡＢＲを記録した。その後、音圧を適宜変更し、ＡＢＲの波形が消失する最大音圧とＡＢＲの波形が検出される最小音圧を５ｄＢ刻みで確認した。ＡＢＲの波形が検出された最小音圧を音圧閾値（ＡＢＲ　ｔｈｒｅｓｈｏｌｄｓ；ｄＢ　ＳＰＬ）とした。なお、９０ｄＢの音刺激でＡＢＲの波形が検出されない場合は、音圧閾値を９５ｄＢ　ＳＰＬとみなした。測定後にＡＢＲの波形データを電子媒体（ＣＤ－Ｒ）に保存した。

[0054] ７．結果

以下の表２（２４ｋＨｚのＡＢＲ閾値の結果）及び表３（３２ｋＨｚのＡＢＲ閾値の結果）に示すとおり、エルゴチオネインを含む抽出粉末を１ｋｇ体重あたり１日３００ｍｇ（エルゴチオネインの含有量は７．５％）、１３週間にわたり投与されたマウスは平均ＡＢＲ閾値の変化がコントロール群より低下した。

[表2]

群	コントコール	酵母抽出粉末
投与量（ｍｇ／ｋｇ）	０	３００
動物数	８	８
平均ＡＢＲ閾値（ｄＢ ＳＰＬ）±Ｓ．Ｅ．）		
投与前	３６±２	３５±２
投与開始から１３週	５４±６	４４±５

[表3]

群	コントロール	酵母抽出粉末
投与量（ｍｇ／ｋｇ）	０	３００
動物数	８	８
平均ＡＢＲ閾値（ｄＢ ＳＰＬ）±Ｓ．Ｅ．）		
投与前	５４±３	５１±４
投与開始から１３週	７６±３	６９±２

[0055] 実施例２：

噴霧乾燥時に固形分中含量が２０重量部となるようにγ－シクロデキストリンを添加した以外は、実施例１と同様の方法で酵母抽出粉末を調製した。得られた酵母抽出粉末について実施例１と同様の方法でＨＰＬＣ測定を行い、該粉末がエルゴチオネイン５８ｍｇ／ｇを含有することを確認した。それ以降の手順も実施例１と同じであり、エルゴチオネインを含む酵母抽出粉末は、実施例１の３０ｍｇ／ｍＬと異なり、３８．８ｍｇ／ｍＬの濃度液となるように調製したものの、動物に投与されるエルゴチオネインの量は実施例１と同量である。

[0056] 動物モデルを用いた試験系は実施例１と同じく１０週齢の雄を使用したが、その数を２８匹に増やした。また、予備飼育期間は１５日間とした。試験群は以下に示す２群とした。各群の動物数は１２匹とした。

[表4]

群番号	群名称	投与量 (mg/kg)	動物数
3	コントロール	0[a)]	１２
4	酵母抽出粉末	３８８	１２

ａ）媒体を１０ｍＬ／ｋｇ投与した。

[0057] 投与後の動物について、実施例１と同様に観察及びＡＢＲ（聴性脳幹反応）検査を行った。投与前（１１週齢）、投与８週（２０週齢）及び最終投与日の翌日（２５週齢）に行った点のみが実施例１と相違する。群ごとの各時点における音圧閾値及び体重について平均値及び標準誤差を算出し、得られた結果を統計学的に解析した。有意差検定は、最初にコントロール群の１１

週齢（Ｐｒｅ）と２５週齢（ｐｏｓｔ）の間で２４及び３２ｋＨｚでの音圧閾値についてＷｉｌｃｏｘｏｎの符号付順位和検定を行い、加齢性に難聴が生じていることを確認した。次に、コントロール群と被検物質群の間で各時点でＷｉｌｃｏｘｏｎの順位和検定を行った。有意水準は５％とし、５％未満（ｐ＜０．０５）と１％未満（ｐ＜０．０１）とに分けて表示した。有意差検定には、市販の統計プログラム（ＳＡＳシステム、ＳＡＳ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　Ｊａｐａｎ株式会社）を用いて行った。

[0058] その結果、以下の表５（２４ｋＨｚのＡＢＲ閾値の結果）及び表６（３２ｋＨｚのＡＢＲ閾値の結果）に示すとおり、エルゴチオネインを含む抽出粉末を１ｋｇ体重あたり１日３８８ｍｇ（エルゴチオネインの含有量は５．８％）、１３週間にわたり投与されたマウスは平均ＡＢＲ閾値の変化がコントロール群より低下した。

[表5]

群	コントロール	酵母抽出粉末
投与量（ｍｇ／ｋｇ）	０	３８８
動物数	１２	１２
投与前	３９±２	３８±２
投与開始から８週	５３±３	４０±４　＃＃
投与開始から１３週	６１±５　＊＊	４７±５　＃

各値は実施例１等同様に平均ＡＢＲ閾値（ｄＢ　ＳＰＬ）±Ｓ．Ｅ．）を示している。以下同様。

＊＊：ｐ＜０．０１、投与前との比較で有意差あり。

＃：ｐ＜０．０５、＃＃：　ｐ＜０．０１、コントロールとの比較で有意差あり。

[表6]

群	コントロール	酵母抽出粉末
投与量（ｍｇ／ｋｇ）	０	３８８
動物数	１２	１２
投与前	５５±３	４９±３
投与開始から８週	７０±２	５６±５　＃
投与開始から１３週	７２±２　＊＊	６３±４

＊＊：ｐ＜０．０１、投与前との比較で有意差あり。

＃：ｐ＜０．０５、コントロールとの比較で有意差あり。

[0059] 表５及び６に示すとおり、いずれの周波数でもエルゴチオネインの難聴抑制効果が確認されたが２４ｋＨｚでは特に顕著であった。難聴の症状は通常高音域から発症するため（Exp Anim. 2015;64(3):241-251）、高周波数（３２ｋＨｚ）ではばらつきも含め抑制効果が認められ難いが、高周波数の場合、投与期間を延ばすことで難聴抑制効果が増大する。

[0060] 上記の結果は、エルゴチオネインにより難聴の進行が遅れ、その結果、測定した時期においてエルゴチオネイン投与群では高周波数帯でのＡＢＲの波形が検出されず、低周波数帯でのＡＢＲの波形が検出されたと解される。換言すると、エルゴチオネインが投与されない場合には可聴周波数が短時間で減少するのに対し、エルゴチオネインが投与されると、減少速度が遅くなると考えられる。

請求の範囲

[請求項1] 内耳性難聴の抑制又は予防のための組成物であって、エルゴチオネインを含む、組成物。

[請求項2] エルゴチオネインが一日当り０．０１ｍｇ／ｋｇ体重以上、１００ｍｇ／ｋｇ体重未満の範囲の量で投与される、請求項１に記載の組成物。

[請求項3] 一日一回又は複数回投与される、請求項２に記載の組成物。

[請求項4] 投与期間が少なくとも一週間以上である、請求項２又は３に記載の組成物。

[請求項5] 投与が経口投与を含む、請求項２～４のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項6] 内耳性難聴が加齢性難聴である、請求項１～５のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項7] 内耳性難聴が薬剤誘導性難聴ではない、請求項１～６のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項8] エルゴチオネインを投与される対象が、聴性脳幹反応（ＡＢＲ）により加齢性難聴と診断されている、請求項１～７のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項9] エルゴチオネインが酵母由来である、請求項１～８のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項10] 酵母が、ロドトルラ（Ｒｈｏｄｏｔｏｒｕｌａ）属の不完全酵母である、請求項９に記載の組成物。

[請求項11] 酵母抽出物を更に含む、請求項８又は９に記載の組成物。

[請求項12] エルゴチオネインが酵母抽出物に含まれている、請求項１１に記載の組成物。

[請求項13] 酵母抽出物にエルゴチオネインが固形分中濃度として０．１～２０％含まれている、請求項１２に記載の組成物。

[請求項14] 酵母抽出物が粉末である、請求項１１～１３のいずれか一項に記載

の組成物。

[請求項15] シクロデキストリンを更に含む、請求項１～１４のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項16] 組成物が医薬、食品又はサプリメントの形態である、請求項１～１５のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項17] エルゴチオネインが一日当り一回０．１ｍｇ以上、１０００ｍｇ未満の範囲の量で投与される、請求項１６に記載の組成物。

[請求項18] 対象における内耳性難聴の抑制又は予防のための方法であって、エルゴチオネインを対象に投与することを含む、方法。

[請求項19] 一日一回又は複数回投与される、請求項１８に記載の方法。

[請求項20] 投与期間が少なくとも一週間以上である、請求項１８又は１９に記載の方法。

[請求項21] 投与が経口投与を含む、請求項１８～２０のいずれか一項に記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/038850

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/4172(2006.01)i; ***A23L 33/10***(2016.01)i; ***A23L 33/14***(2016.01)i; ***A61K 36/06***(2006.01)i; ***A61K 47/40***(2006.01)i; ***A61P 27/16***(2006.01)i
FI: A61K31/4172; A61P27/16; A61K36/06; A61K47/40; A23L33/10; A23L33/14

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)

A61K31/4172; A23L33/10; A23L33/14; A61K36/06; A61K47/40; A61P27/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2019-524657 A (OTONOMY, INC.) 05 September 2019 (2019-09-05) claims, paragraphs [0484]-[0487]	1-21
A	JP 2011-37738 A (CHUBE UNIVERSITY) 24 February 2011 (2011-02-24) claims, examples 1-9	1-21
A	JP 2021-65226 A (LS CORP K.K.) 30 April 2021 (2021-04-30) claims, examples	1-21
A	齊藤威、吉村義隆, エルゴチオネインの再発見　－その特殊な機能と存在の意味－, 玉川大学農学部研究教育紀要, 2016, no. 1, pp. 17-41 (SAITO, Takeshi, YOSHIMURA, Yoshitaka. Rediscovery of Ergothioneine: Its Special Functions and the Meanings for Existence. Bulletin of the College of Agriculture. Tamagawa University.) entire text	1-21
A	HAN, Yiwen et al., The current status of biotechnological production and the application of a novel antioxidant ergothioneine, Critical Reviews in Biotechnology, 08 February 2021, vol. 41, no. 4, pp. 580-593 entire text	1-21

☑ 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
05 December 2022	**20 December 2022**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2017-225368 A (OKAYAMA UNIVERSITY) 28 December 2017 (2017-12-28) claims, paragraphs [0002], [0033], examples 4-7	9-14
A	WO 2016/104437 A1 (OKAYAMA UNIVERSITY) 30 June 2016 (2016-06-30) claims, paragraphs [0003], [0020], example 16	9-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/038850

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2019-524657 A	05 September 2019	US 2018/0000950 A1 claims, paragraphs [0500]-[0503] WO 2018/005830 A1 EP 3478269 A1 KR 10-2019-0024983 A CN 109689027 A	
JP 2011-37738 A	24 February 2011	(Family: none)	
JP 2021-65226 A	30 April 2021	CN 112674351 A KR 10-2021-0045940 A	
JP 2017-225368 A	28 December 2017	(Family: none)	
WO 2016/104437 A1	30 June 2016	US 2021/0164004 A1 claims, paragraphs [0002], [0057], example 16	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/038850

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K 31/4172(2006.01)i; A23L 33/10(2016.01)i; A23L 33/14(2016.01)i; A61K 36/06(2006.01)i; A61K 47/40(2006.01)i; A61P 27/16(2006.01)i
FI: A61K31/4172; A61P27/16; A61K36/06; A61K47/40; A23L33/10; A23L33/14

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））

A61K31/4172; A23L33/10; A23L33/14; A61K36/06; A61K47/40; A61P27/16

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	１９７１－２０２２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２２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/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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
A	JP 2019-524657 A (オトノミー，インク．) 05.09.2019 (2019-09-05) 特許請求の範囲、［０４８４］～［０４８７］	１－２１
A	JP 2011-37738 A (学校法人中部大学) 24.02.2011 (2011-02-24) 特許請求の範囲、実施例１～９	１－２１
A	JP 2021-65226 A (株式会社エル・エスコーポレーション) 30.04.2021 (2021-04-30) 特許請求の範囲、実施例	１－２１
A	齊藤威、吉村義隆，エルゴチオネインの再発見　－その特殊な機能と存在の意味－，玉川大学農学部研究教育紀要，2016，第１号，p.17-41 全文	１－２１
A	HAN, Yiwen et al., The current status of biotechnological production and the application of a novel antioxidant ergothioneine, Critical Reviews in Biotechnology, 2021.02.08, Vol.41, No.4, p.580-593 全文	１－２１

☑ 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抵触するものではなく、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
05.12.2022	20.12.2022

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
上條　のぶよ　4C 9454
電話番号 03-3581-1101 内線 3480

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
A	JP 2017-225368 A (国立大学法人 岡山大学) 28.12.2017 (2017-12-28) 特許請求の範囲、［０００２］、［００３３］、実施例４～７	９－１４
A	WO 2016/104437 A1 (国立大学法人 岡山大学) 30.06.2016 (2016-06-30) 特許請求の範囲、［０００３］、［００２０］、実施例１６	９－１４

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/038850

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2019-524657 A	05.09.2019	US 2018/0000950 A1 CLAIMS, [0500]-[0503] WO 2018/005830 A1 EP 3478269 A1 KR 10-2019-0024983 A CN 109689027 A	
JP 2011-37738 A	24.02.2011	（ファミリーなし）	
JP 2021-65226 A	30.04.2021	CN 112674351 A KR 10-2021-0045940 A	
JP 2017-225368 A	28.12.2017	（ファミリーなし）	
WO 2016/104437 A1	30.06.2016	US 2021/0164004 A1 CLAIMS, [0002], [0057], EXAMPLE 16	