

(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2014-227380
(P2014-227380A)

(43) 公開日 平成26年12月8日(2014.12.8)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 36/48 (2006.01)	A 61 K 35/78	J 2 B 1 5 0
A61P 25/24 (2006.01)	A 61 P 25/24	4 B 0 1 8
A23L 1/30 (2006.01)	A 23 L 1/30	B 4 C 0 8 8
A23K 1/16 (2006.01)	A 23 K 1/16	3 O 4 C

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2013-108665 (P2013-108665)	(71) 出願人	000234605 白鳥製薬株式会社 千葉県習志野市津田沼6丁目11番24号
(22) 出願日	平成25年5月23日 (2013.5.23)	(74) 代理人	110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100077562 弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736 弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156 弁理士 村田 正樹
		(74) 代理人	100111028 弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗うつ剤

(57) 【要約】

【課題】抗うつ剤を提供する。

【解決手段】ブテア スペルバ又はその抽出物を有効成分とする抗うつ剤。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ブテア スペルバ又はその抽出物を有効成分とする抗うつ剤。

【請求項 2】

ブテア スペルバの抽出物がブテア スペルバの低級アルコール抽出物である請求項 1 記載の抗うつ剤。

【請求項 3】

低級アルコールがエタノールである請求項 2 記載の抗うつ剤。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

10

【0001】

本発明は、抗うつ剤に関する。

【背景技術】**【0002】**

高ストレス社会が到来した我が国では、精神的に疲弊し、不安やうつ状態を訴えるうつ病患者が急増し、大きな社会問題となっている。うつ病は、患者や患者家族の精神的・経済的負担が大きいだけでなく、甚大な社会経済的損失を与える。うつの発症には、様々な説が提唱されているものの未だ結論は得られていない。

従来、うつの治療薬としては、三環系抗うつ薬、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬、モノアミンオキシダーゼ阻害薬等が用いられている。しかし、効果や副作用の点から、長期に渡って継続して服用でき、うつの発症を予防できるような安全で有効性の高い新たな物質の開発が求められている。

【0003】

一方、マメ科植物ブテア スペルバ (*Butea superba*) は、古くから特に高齢者の滋養強壮に用いられている安全性の高い植物である。また、ブテア スペルバは、勃起障害、精力増強に有用であること(非特許文献 1)、血小板凝集阻害作用を有すること(特許文献 1)等が報告されている。

しかしながら、ブテア スペルバとうつとの関連については知られていない。

【先行技術文献】

30

【特許文献】**【0004】****【特許文献 1】特開 2004-131390 号公報****【非特許文献】****【0005】****【非特許文献 1】Asian J Androl、2003年9月、第5巻、p.243-246****【発明の概要】****【発明が解決しようとする課題】****【0006】****【発明は、抗うつ剤を提供することに関する】**

40

【課題を解決するための手段】**【0007】**

本発明者は、天然物中にうつに有用な物質を鋭意探索した結果、ブテア スペルバが優れた抗うつ作用を有することを見出し、本発明を完成した。

【0008】

すなわち、本発明は、ブテア スペルバ又はその抽出物を有効成分とする抗うつ剤により上記課題を解決したものである。

【発明の効果】**【0009】**

本発明の抗うつ剤は、優れた抗うつ作用を有すると共に、副作用が少なく、安全性に優

50

れるため、うつの予防及び治療に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】O BXマウスを用いた尾懸垂試験の結果を示す図である。

【図2】CMS負荷マウスを用いた尾懸垂試験の結果を示す図である。

【図3】蔗糖嗜好性試験の結果を示す図である。

【図4】血中コルチコステロン量を示す図である。

【図5】マウス海馬及び大脳皮質における脳由来神経栄養因子(BDNF)mRNA発現量を示す図である。

【発明を実施するための形態】

10

【0011】

本発明で用いられるブテア スペルバ(*Butea superba*)はマメ科コチヨウ亞科に属する熱帯植物の一種である。斯かる植物は、根、茎、花、葉等いずれの任意の部位を使用することができるが、根を用いるのが好ましい。

ブテア スペルバは、そのまま用いても乾燥させて用いてもよく、更にそれらを処理して用いてもよい。処理としては、例えば、切断、破碎、磨碎、粉碎等が挙げられる。

【0012】

ブテア スペルバの抽出物は、ブテア スペルバをそのままもしくは乾燥させ、又はそれらを処理した後に抽出工程に付すことによって得ることができる。ブテア スペルバの抽出物としては、市販されているもの、常法により得られる各種溶媒抽出物であってよい。

ブテア スペルバの抽出物を得る抽出手段は、特に制限されず、例えば、固液抽出、浸漬、煎出、浸出、還流抽出、超音波抽出、マイクロ波抽出、攪拌等の手段を用いることができる。

【0013】

抽出のための溶媒としては、例えば、水、低級アルコール、多価アルコール、ケトン類、エステル類、エーテル類、ポリエーテル類、炭化水素類、芳香族炭化水素類、ハロゲン化炭化水素類、超臨界二酸化炭素、オイル類、これらの混合物等が挙げられる。なかでも、水、低級アルコール、低級アルコール-水混合液が好ましい。

低級アルコールとしては、炭素数1~5のアルコールが好ましく、メタノール、エタノール、プロパノールがより好ましく、エタノールが特に好ましい。

【0014】

抽出のための溶媒として低級アルコール-水混合液を使用する場合には、低級アルコールと水との配合割合(容量比)としては、0.001~100:99.999~0が好ましく、5~95:95~5がより好ましい。エタノール水溶液の場合、エタノール濃度が50~95(v/v)%であることが好ましい。

【0015】

溶媒の使用量としては、ブテア スペルバ(乾燥質量換算)1gに対して1~100mlが好ましく、抽出時間としては、30分間~2日間が好ましく、1時間~12時間がより好ましい。このときの抽出温度は、0~溶媒沸点、より好ましくは20~100である。このような抽出が終了してから溶媒を分取し、更に溶媒を加えて抽出する操作を数回繰り返すのが好ましい。

【0016】

斯くして得られるブテア スペルバの抽出物は、抽出液や画分をそのまま用いてもよく、適宜な溶媒で希釈した希釈液として用いてもよく、或いは濃縮エキスや乾燥粉末としたり、ペースト状に調製したものでもよい。また、凍結乾燥し、用時に、抽出に用いられる溶媒、例えば水等で希釈して用いることもできる。

【0017】

ブテア スペルバの抽出物は、食品上・医薬品上許容し得る規格に適合し本発明の効果を発揮するものであれば粗精製物であってもよく、さらに得られた粗精製物を公知の分離

10

20

30

40

50

精製方法を適宜組み合わせてこれらの純度を高めてもよい。精製手段としては、有機溶媒を用いる沈殿法、遠心分離、限界濾過膜、高速液体クロマトグラフやカラムクロマトグラフ等が挙げられる。

【0018】

ブテア スペルバ又はその抽出物は、後述する実施例に示すように、うつモデルである嗅球摘出(OBX)マウス及び慢性的軽度ストレス(CMS)負荷マウスにおいて、尾懸垂試験における無動時間を有意に短縮した。また、ストレス応答の指標である蔗糖嗜好性と血中コルチコステロンレベルを有意に改善した。更に、うつ病態発症関連因子の一つとして知られている脳由来神経栄養因子(BDNF)の遺伝子発現量の低下を有意に抑制した。従って、本発明は、ブテア スペルバ又はその抽出物を有効成分とする抗うつ剤を提供する。

本明細書で云ううつとは、うつ病、例えば大うつ病、双極性うつ病、うつ状態等が挙げられる。

【0019】

本発明の抗うつ剤は、うつを予防、治療及び/又は改善するための医薬品、食品又は飼料等の他の組成物の製造のために使用することができる。

これら医薬品、食品及び他の組成物は、本発明の効果を奏する限り、必要に応じて、薬学的に許容される担体、添加剤、他の有効成分、薬理成分等を含有していてもよい。

【0020】

上記医薬品、食品及び他の組成物における抗うつ剤の含有量は、ブテア スペルバの乾燥物換算として、好ましくは0.5質量%以上、より好ましくは1質量%以上、更に好ましくは10質量%以上であり、他方、好ましくは100質量%以下、より好ましくは90質量%以下、更に好ましくは50質量%以下である。

【0021】

医薬品は任意の投与形態で投与され得る。投与形態としては、例えば注射剤、坐剤、吸入薬、経皮吸収剤、外用剤等による非経口投与又は錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与が挙げられる。

このような種々の剤型の医薬品を調製するには、薬学的に許容される担体、例えば賦形剤、結合剤、增量剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、嬌味剤、香料、被膜剤、希釈剤等を適宜組み合わせて用いることができる。

【0022】

また、食品又は他の組成物の形態は、固形、半固形又は液状であり得る。食品としては、例えば、パン類、ケーキ類、麵類、菓子類、ゼリー類、冷凍食品、アイスクリーム類、乳製品、飲料等の各種食品の他、上述した経口投与製剤と同様の形態(錠剤、カプセル剤、シロップ等)が挙げられる。

種々の形態の食品又は他の組成物を調製するには、他の食品材料や、溶剤、軟化剤、油、乳化剤、防腐剤、香料、安定剤、着色剤、酸化防止剤、保湿剤、増粘剤等を適宜組み合わせて用いることができる。

【0023】

本発明の抗うつ剤の投与量又は摂取量は、対象者の状態、体重、性別、年齢又はその他の要因に従って変動し得るが、経口投与又は摂取の場合成人1人当たり、ブテア スペルバの乾燥物換算として、1日あたり0.1~20mg/kgとすることが好ましく、1mg~10mg/kgとするのがより好ましい。

【実施例】

【0024】

1. ブテア スペルバ抽出物(SO)の調製

ブテア スペルバの根の乾燥粉碎物52gを95(v/v)%エタノール200mLで水浴中75℃、2時間加熱し、抽出ろ過した。この過程を3回繰り返し、全抽出液を併せて減圧濃縮した。濃縮液は40℃で3日間、真空乾燥し、抽出物として4.63gを回収した(1g乾燥根粉末は0.089g抽出物に相当)。

10

20

30

40

50

ブテア スペルバの（成人）での一日摂取量はブテア スペルバ乾燥物で 10 mg / kg / 日とみなし、その 10 倍から 30 倍容量である 100 mg / kg / 日及び 300 mg / kg / 日に相当する抽出物を実験期間中にモデル動物に経口投与した。

【0025】

2. 嗅球摘出（OBX）マウスの作製

9 週齢 ddY 系雄性マウスを用いた。ペントバルビタール麻酔下で頭蓋を切開して、嗅球を吸引除去した。尚、切開部位には局所麻酔薬リドカインを塗布した。嗅球摘出を行わず、同様の手術を行ったマウスを偽手術群とした。施術 3 日後より、ブテア スペルバ抽出物、或いはイミプラミン（IMP、10 mg / kg / 日；腹腔内投与）の投与を開始し、投与は 1 日 1 回、実験期間中継続した。

10

手術 2 週間後より次の行動実験を開始した。

【0026】

3. 慢性的軽度ストレス（CMS）負荷マウス

6 週齢 ddY 系雄性マウスを用い、異なる種類の軽度ストレス刺激（CMS）を表 1 に示す順序で実験期間中（6 週間）負荷した。ストレスを負荷せずに通常の飼育ケージで飼育したマウスを非ストレス群とした。第 1 週に各動物群の蔗糖摂取量を測定後、上記と同様にブテア スペルバ抽出物、或いはイミプラミンの投与（1 日 1 回）を開始し、実験期間中継続した。

【0027】

【表1】

ストレッサー	Mon	Tue	Wed	Thu	Fri	Sat	Sun
18時間絶水絶食					Fri 15:00 - Sat 9:00		
蔗糖嗜好試験(1時間)					9:00 - 10:00		
45度傾斜ケージ内曝露(12時間)	8:00 - 20:00						
食物接近制限(1時間)		10:00 - 11:00		12:00 - 13:00			
空給水瓶曝露(3時間)	17:00 - 20:00			9:00 - 12:00			
濡れ床敷きを入れたケージ内での飼育(21時間)*			Tue 13:00 - Wed 10:00				
光**曝露(36時間)			Tue 6:00 - Wed 18:00			Tue 6:00 - Wed 18:00	
断続的不快音曝露(3時間)			15:00 - 18:00			15:00 - 18:00	
異なるケージに飼育したマウスへの曝露(2時間)					8:00 - 10:00	16:00 - 18:00	

* : 50グラムおがくず床敷きを水200mlで湿らせた飼育ケージ内にて21時間飼育
** : 明るさ200luxの室内にケージを置き、36時間飼育

【0028】

4. 尾懸垂試験

(1) O BXマウスを用いてマウスのうつ様行動を測定した。マウス尾部を観察箱内の床より 50 cm の位置に懸垂し、逃避不可能なストレスを 8 分間負荷した。無動を 0.05 cm² / sec 以下の動きと定義し、測定開始 2 分後より 6 分間無動時間を SMART system で解析した。

試験には、偽手術群、O BX - 水投与群、ブテア スペルバ抽出物 (100 mg / kg / 日) 投与群 (SO (100) と表記)、ブテア スペルバ抽出物 (300 mg / kg / 日) 投与群 (SO (300) と表記、以下同じ)、IMP 投与群 (IMP (10) と表記、以下同じ) の 5 群を用意し、各群 10 匹とした。なお、偽手術群、O BX - 水投与群にはブテア スペルバ抽出物の代わりに水を投与した。

統計処理は、偽手術群と O BX - 水投与群との比較を student's t-test により、O BX - 水投与群と薬物投与群との比較を一元配置分散分析の後、Student - Newman - Keuls test で行った。危険率 P が 0.05 未満の場合を有意と判定した。結果を図 1 に示す。

【0029】

(2) CMS負荷マウスを用いて、上記(1)と同様にマウスのうつ様行動を測定した。試験には、非ストレス・水/生理食塩水投与群、CMS負荷・水/生理食塩水投与群、ブテアスペルバ抽出物(300mg/kg/日)投与群、IMP投与群の6群を用意し、各群12匹とした。なお、実験期間中、非ストレス・水/生理食塩水投与群、CMS負荷・水/生理食塩水投与群にはブテアスペルバ抽出物の代わりに水又は生理食塩水を同量投与した。

統計処理は、非ストレス群とCMS負荷・水/生理食塩水投与群との比較をstudent's t-testにより、CMS負荷・水/生理食塩水投与群と薬物投与群との比較を一元配置分散分析の後、Student-Newman-Keuls testで行った。危険率Pが0.05未満の場合を有意と判定した。結果を図2に示す。

【0030】

図1より、偽手術群と比べOBX・水投与群では無動時間が有意に延長し、うつ様行動が発現することが明らかとなった。ブテアスペルバ抽出物(300mg/kg/日)投与群、IMP投与群では、いずれもOBX・水投与群と比べて有意に無動時間が短縮した。

また、図2より、CMS負荷・水/生理食塩水投与群では非ストレス群と比較して無動時間が有意に延長した。一方、ブテアスペルバ抽出物(300mg/kg/日)投与群、IMP投与群の無動時間は有意に短縮し、非ストレス群のレベルまで回復した。

【0031】

5. 蔗糖嗜好性試験

CMS負荷マウスを用いて、毎週18時間絶水絶食処置(表1参照)直後、蔗糖嗜好試験を行った。試験では各飼育ケージに、水道水と10%蔗糖水を含む2種類のボトルを設置した。試験開始30分後、ボトルの位置を入れ替え、更に30分間設置した。

蔗糖嗜好性(%)は、(10%蔗糖水摂取量 / 10%蔗糖水摂取量 + 水道水摂取量) × 100により算出した。

試験には、非ストレス・水/生理食塩水投与群、CMS負荷・水/生理食塩水投与群、ブテアスペルバ抽出物(300mg/kg/日)投与群、IMP投与群の6群を用意し、各群12匹とした。なお、実験期間中、非ストレス・水/生理食塩水投与群、CMS負荷・水/生理食塩水投与群にはブテアスペルバ抽出物の代わりに水又は生理食塩水を同量投与した。

統計処理は二元配置反復測定分散分析(two-way repeated measure ANOVA)で行い、危険率Pが0.05未満の場合を有意と判定した。結果を図3に示す。

【0032】

一般にうつ病態の動物では蔗糖嗜好性が低下することが知られている。図3より、CMS負荷・水/生理食塩水投与群ではストレス負荷開始4週以降に有意な嗜好性の低下が認められた。一方、ブテアスペルバ抽出物(300mg/kg/日)投与群及びIMP投与群では嗜好性低下は有意に抑制された。

【0033】

6. 血中コルチコステロン量の測定

CMS負荷(6週間)後、断頭し、頸部より速やかに採血してヘパリン処理したチューブに入れ、5分間遠心分離(4、3,000r/min)後、上清をとり血清とした。血中コルチコステロン濃度の測定はAssay Max Corticosterone ELISA Kit (Assaypro)を用いて行った。コルチコステロン抗体でコーティングされた96穴マイクロプレートに25μLの血清を入れ、室温で2時間インキュベート後、200μl wash bufferで5回洗浄した。液を取り除き、50μl Streptavidin-Peroxidase Conjugateを入れ、30分間インキュベートした。さらに200μl wash bufferで5回洗浄した後、50μl Chromogen Substrateを入れて20分間

10

20

30

40

50

インキュベートした後、50 μ l Stop Solution を加えた。分光光度計 (Sunrise Classic; TECAN JAPAN Kawasaki) を用いて450 nmにおける吸光度を測定した。

試験には、非ストレス群、CMS負荷 - 水投与群、ブテア スペルバ抽出物 (300 mg / kg / 日) 投与群、IMP投与群の4群を用意し、各群3匹の血清サンプルを解析した。なお、実験期間中、非ストレス群、CMS負荷 - 水投与群にはブテア スペルバ抽出物の代わりに水を同量投与した。

統計処理は、非ストレス群とCMS負荷 - 水投与群との比較をstudent's t-testにより、CMS負荷 - 水投与群と薬物投与群との比較を一元配置分散分析の後、Student-Newman-Keuls testで行った。危険率Pが0.05未満の場合を有意と判定した。結果を図4に示す。
10

【0034】

図4より、CMS負荷 - 水投与群では非ストレス群と比べ、血中コルチコステロンレベルが有意に上昇していることが明らかとなった。一方、この上昇はブテア スペルバ抽出物 (300 mg / kg / 日) 投与及びイミプラミン (10 mg / kg / 日) 投与により有意に抑制された。

【0035】

7. 脳由来神経栄養因子遺伝子発現量の測定

CMS負荷 (6週間) 後、マウスをpentobarbital sodium (60 mg / kg, i.p.) 麻酔で断頭し、脳より大脳皮質及び海馬を摘出した。組織は速やかに液体窒素で凍結し、以降の操作を行うまで -80 $^{\circ}$ C で保存した。Sepazol (Nacdalai Tesque, Kyoto) を用いて各組織よりTotal RNAを抽出した。抽出方法は添付のプロトコルに従って行った。RNA濃度はNanoVue (GE healthcare) を用いて測定した。逆転写反応はOligo dT Primer (Invitrogen, Rockville, MD, USA) 及びM-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて行い、cDNAを合成した。このcDNAをテンプレートとし、下記のBDNF遺伝子及び -actinプライマーセットを用いてリアルタイムPCR法にてBDNF遺伝子発現量を定量した。尚、PCRにはPower SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) とStep One Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いた。
20 30

【0036】

BDNF mRNA (MA024756)

5' - C T G A A T G A A T G G A C C C A A T G A G A A C - 3' (forward)
(配列番号1)

5' - C T G A T G C T C A G G A A C C C A G G A - 3' (reverse) (配列番号2)

【0037】

-actin mRNA (NM_030387)

5' - C A T C C G T A A A G A C C T C T A T G C C A A C - 3' (forward)
(配列番号3)

5' - A T G G A G C C A C C G A T C C A C A - 3' (reverse)
(配列番号4)

【0038】

試験には、非ストレス - 水 / 生理食塩水投与群、CMS負荷 - 水 / 生理食塩水投与群、ブテア スペルバ抽出物 (300 mg / kg / 日) 投与群、IMP投与群の6群を用意し、各群5匹又は6匹とした。

統計処理は、非ストレス群とCMS負荷 - 水 / 生理食塩水投与群との比較をstudent's t-testにより、CMS負荷 - 水 / 生理食塩水投与群と薬物投与群との比
40 50

較を一元配置分散分析の後、Student-Newman-Keuls testで行った。危険率Pが0.05未満の場合を有意と判定した。結果を図5に示す。

【0039】

図5に示すとおり、CMS負荷-水/生理食塩水投与群では非ストレス群と比べ、海馬組織及び大脳皮質におけるBDNF遺伝子発現量の有意な低下が認められた。海馬における発現量低下はブテアスペルバ抽出物(300mg/kg/日)投与群及びIMP投与群で有意に抑制された(図5のA)。大脳皮質におけるBDNF遺伝子発現量の低下もブテアスペルバ抽出物(300mg/kg/日)投与によって抑制される傾向がみられた。

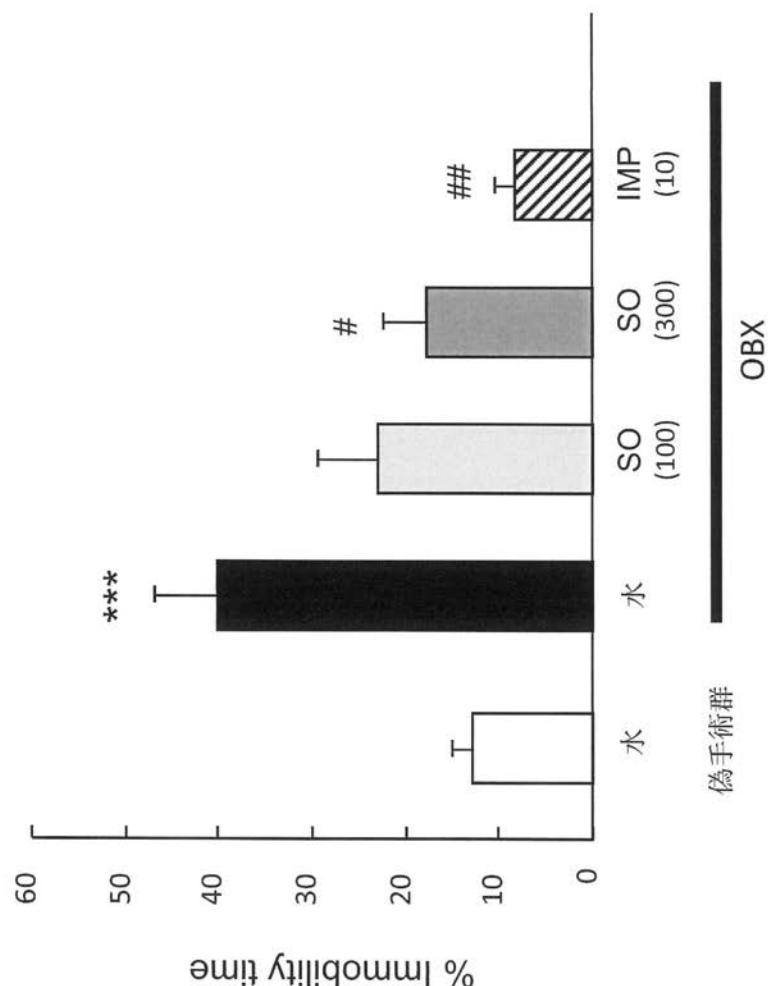
これらの結果から、ブテアスペルバは海馬BDNF転写を促進すると考えられた。

10

【0040】

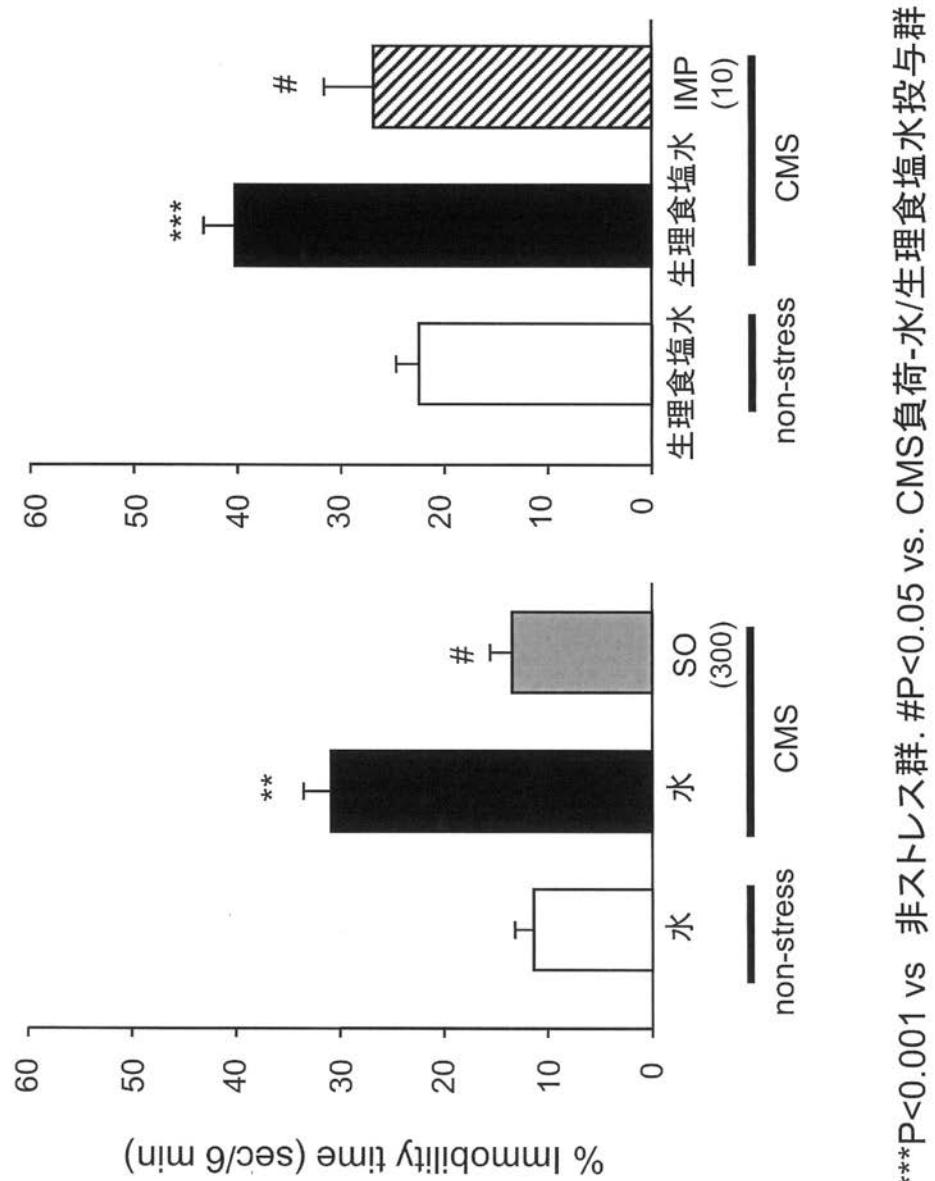
以上より、ブテアスペルバの反復摂取又は投与によって、うつの発症の予防や改善を図れる可能性が確認された。

【図1】



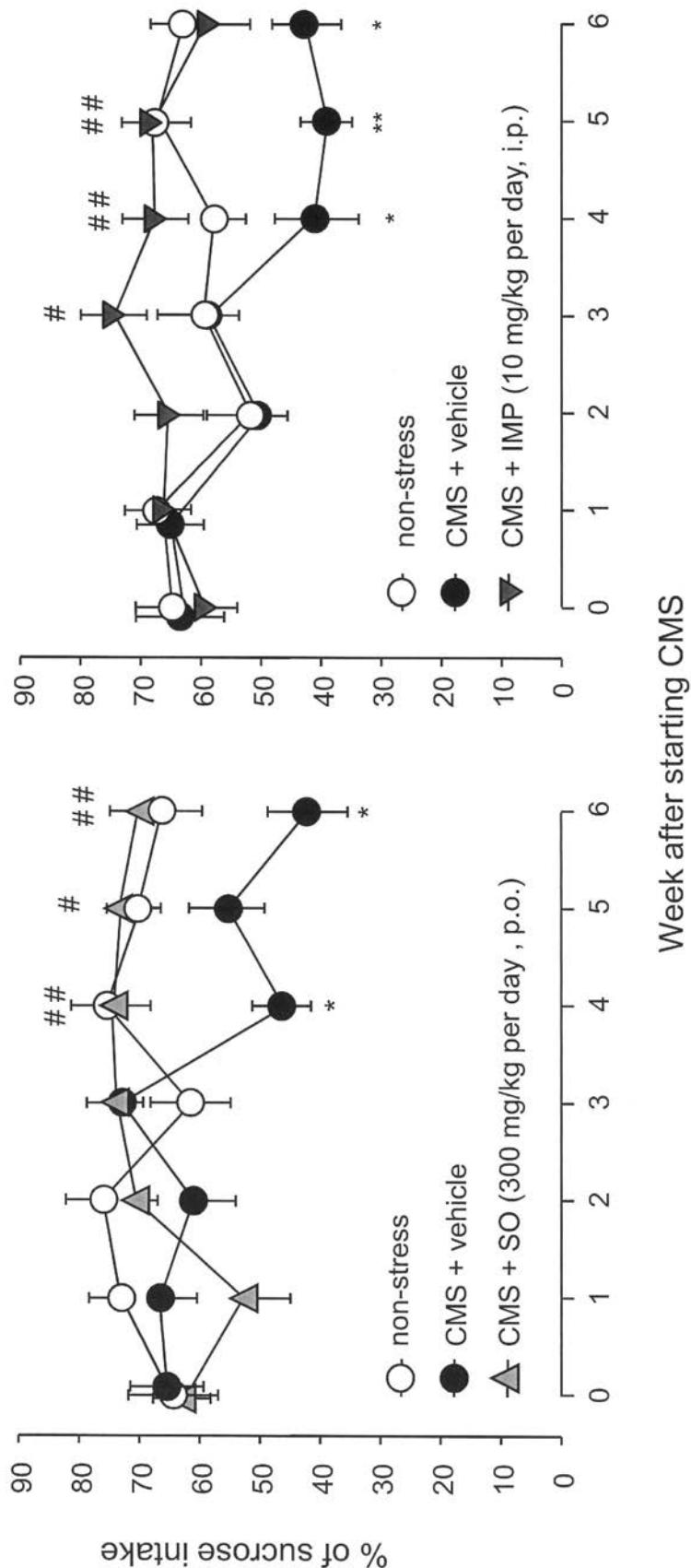
***P<0.001, vs 偽手術群. #P<0.05, ##P<0.01 vs. OBX-水投与群

【図2】



P<0.01, *P<0.001 vs. CMS負荷-水/生理食塩水投与群
#P<0.05 vs. CMS負荷-水/生理食塩水投与群

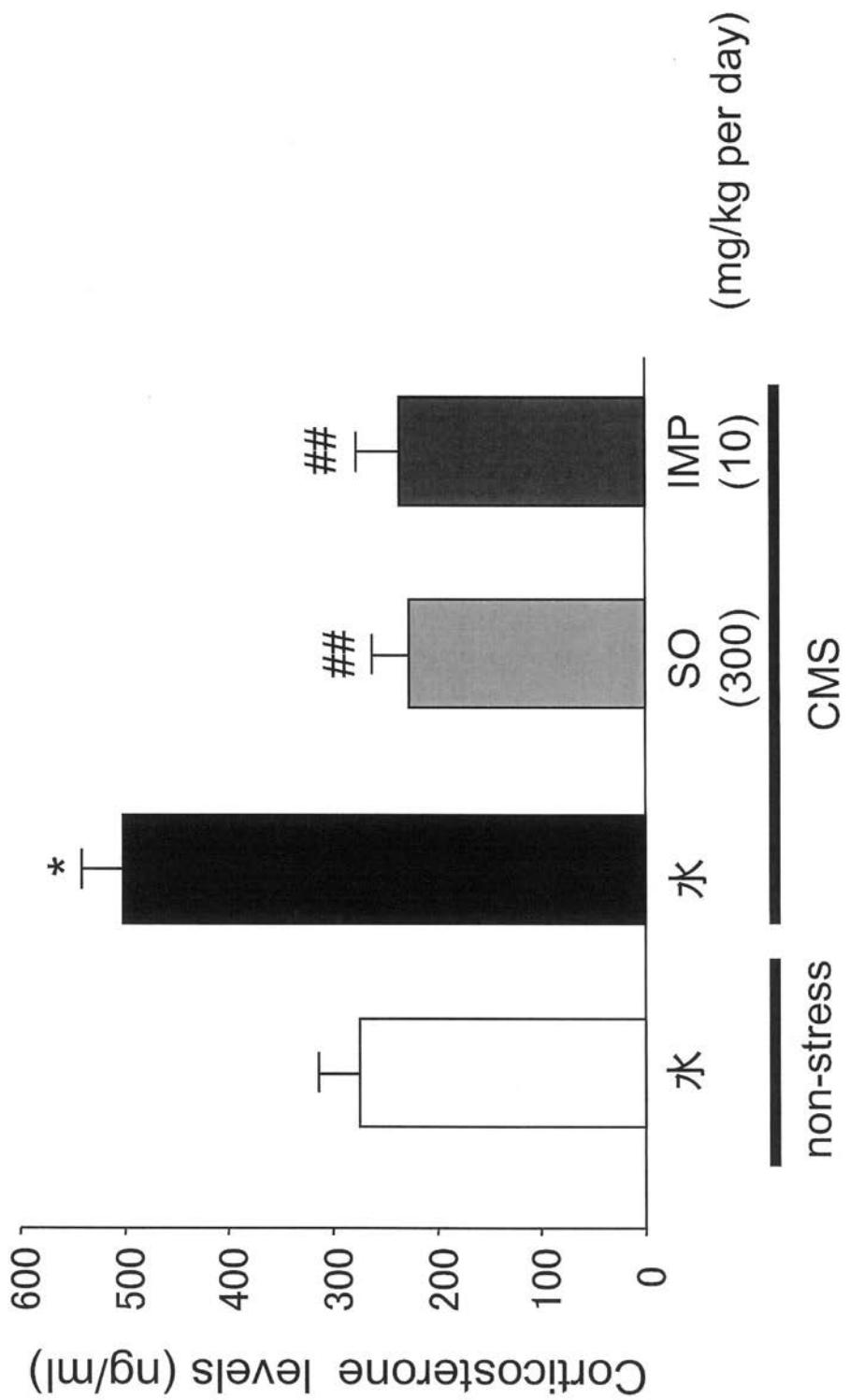
【図3】



*P<0.05, **P<0.01 vs. 非ストレス群. #P<0.05, ##P<0.01 vs. CMS負荷-水/生理食塩水投与群

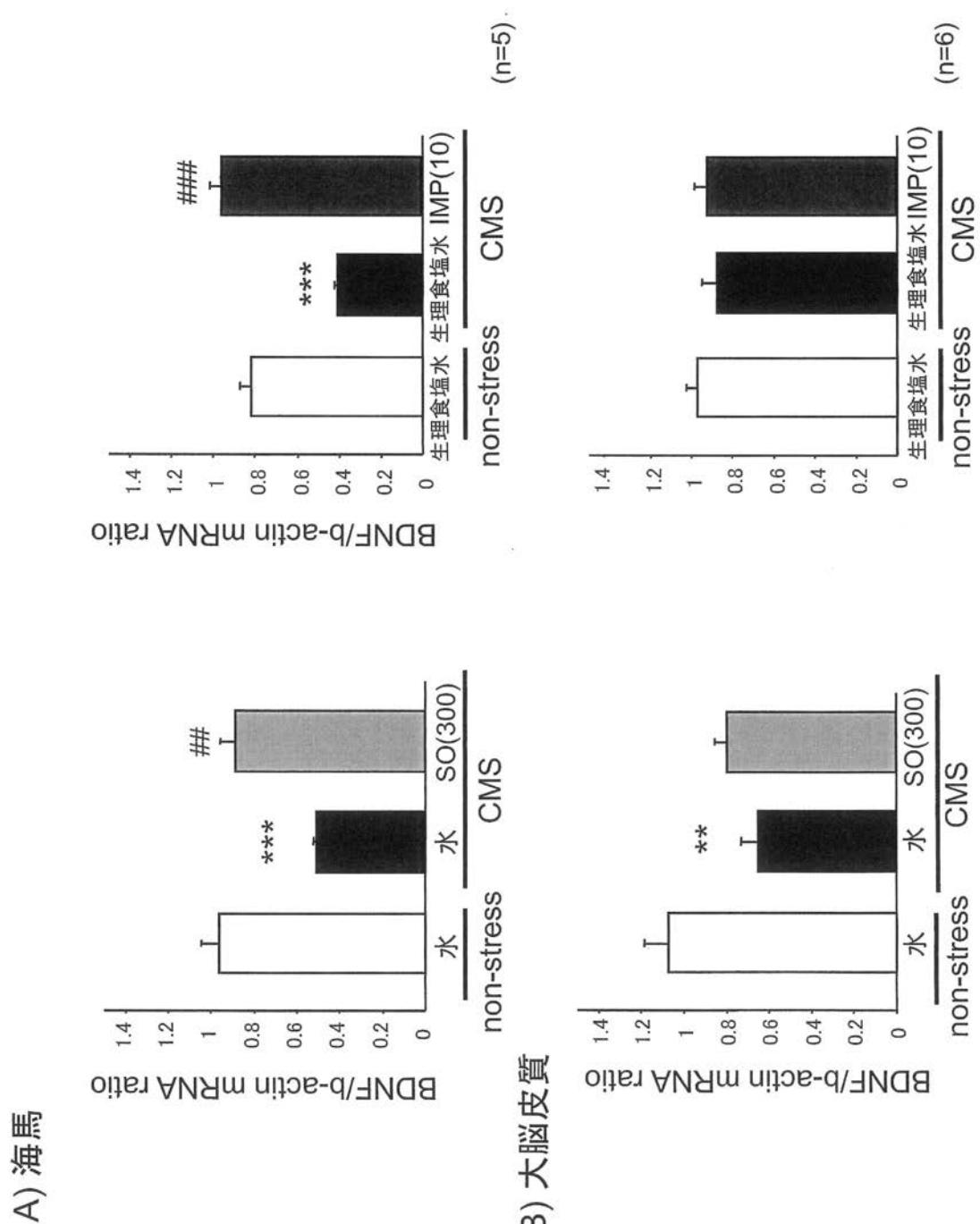
【図4】

CMS負荷によるストレスホルモン上昇に対するソフオシン及びミミプラミンの効果



*P<0.05, vs 非ストレス群. ##P<0.01 vs. CMS負荷-水/生理食塩水投与群

【図5】



フロントページの続き

(72)発明者 樋口 義洋
千葉県習志野市 6 - 1 1 - 2 4 白鳥製薬株式会社内

(72)発明者 松本 欣三
富山県射水市中太閤山 3 - 1 2

(72)発明者 水木 大脩
富山県富山市古沢 6 3 0 - 2 オリジン大樹 3 0 7

(72)発明者 石川 勉
千葉県市原市ちはら台西 6 - 2 7 - 8

F ターム(参考) 2B150 AB10 DD42 DD57
4B018 MD48 MD61 ME14 MF01
4C088 AB59 AC11 BA10 CA06 NA14 ZA12