(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-539499
(P2024-539499A)
(43)公表日　令和6年10月28日(2024.10.28)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ　31/7048(2006.01)		Ａ６１Ｋ	31/7048	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ　25/00　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	25/00	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全19頁）

(21)出願番号　特願2024-547815(P2024-547815)
(86)(22)出願日　令和4年10月25日(2022.10.25)
(85)翻訳文提出日　令和6年4月24日(2024.4.24)
(86)国際出願番号　PCT/CN2022/127372
(87)国際公開番号　WO2023/072069
(87)国際公開日　令和5年5月4日(2023.5.4)
(31)優先権主張番号　63/271,411
(32)優先日　令和3年10月25日(2021.10.25)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　524158209
陳令儀
台湾　３００１３　新竹市光復路二段１０１号
(71)出願人　524158232
陳裕仁
台湾　３００１３　新竹市光復路二段１０１号
(74)代理人　100091683
弁理士　▲吉▼川　俊雄
(74)代理人　100179316
弁理士　市川　寛奈
(72)発明者　陳令儀
台湾　３００１３　新竹市光復路二段１０１号
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　神経修復を促進するためのイソロイホリン及びその誘導体の用途

(57)【要約】
イソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）及びその誘導体の新たな用途。当該イソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）及びその誘導体は、損傷した脳ニューロン及び網膜神経の再生を促進可能である。
【選択図】図３Ａ

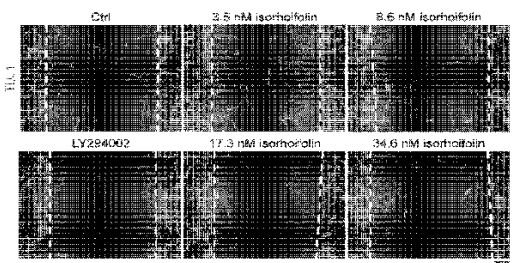
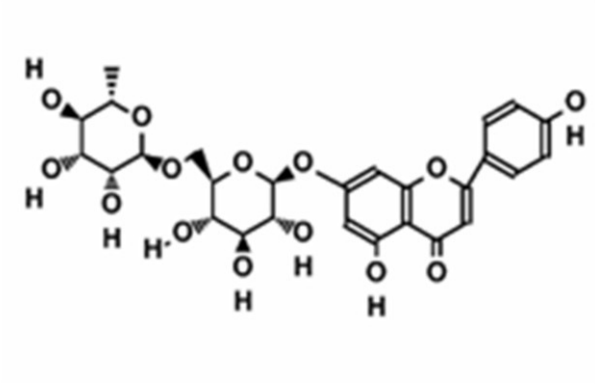


図3A

【特許請求の範囲】
【請求項１】
神経損傷を治療する医薬品を製造するためのイソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）及びその誘導体の用途。
【請求項２】
前記イソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）の誘導体はナリルチン（Ｎａｒｉｒｕｔｉｎ）であることを特徴とする請求項１に記載の用途。
【請求項３】
前記神経損傷は中枢神経又は末梢神経の損傷であることを特徴とする請求項１に記載の用途。
【請求項４】
前記神経損傷はニューロンの損傷であることを特徴とする請求項１に記載の用途。
【請求項５】
前記神経損傷は、皮質ニューロン（ｃｏｒｔｉｃａｌ　ｎｅｕｒｏｎｓ）、海馬ニューロン（ｈｉｐｐｏｃａｍｐａｌ　ｎｅｕｒｏｎｓ）又は網膜ニューロン（ｒｅｔｉｎａｌ　ｎｅｕｒｏｎｓ）の損傷を含むことを特徴とする請求項１に記載の用途。
【請求項６】
前記治療とは、神経の再生、神経数の増加又は神経の修復であることを特徴とする請求項１に記載の用途。
【請求項７】
前記イソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）及びその誘導体は、鼻腔から投与されることで、血液脳関門（ｂｌｏｏｄ－ｂｒａｉｎ　ｂａｒｒｉｅｒ）を通過して大脳に進入可能であることを特徴とする請求項１に記載の用途。
【請求項８】
前記イソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）及びその誘導体の有効用量は１ｎＭ～８６４μＭであることを特徴とする請求項１に記載の用途。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、神経修復を促進するためのイソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）及びその誘導体の用途を提供する。
【背景技術】
【０００２】
現在、外傷性脳損傷（ＴＢＩ）のような神経損傷については、世界中で毎年約７千万人がその病症に悩まされている。一般的な治療法は、物理療法、高気圧酸素治療、経頭蓋磁気刺激及び経頭蓋直流電気刺激といった非侵襲的な治療法であり、ＴＢＩ後の抑うつや認知機能を改善可能である。しかし、現在のところ、脳損傷後の神経再生を促進可能とする有効な薬物は存在しない。
【０００３】
外傷性脳損傷は、外力が脳部に衝撃を与えることで生じる損傷であり、世界中で毎年約７０００万近くの診断事例がある。外傷性脳損傷は、脳神経を損傷させることで、患者の行動又は認知機能の欠損を招来する。中枢神経系は損傷すると再生や回復が難しいため、現在の医学では、外傷性脳損傷について神経再生を有効に促進する治療法が存在しない。また、脳外傷患者は、一定期間後に脳部に病変が生じたり、将来的に脳神経変性疾患が生じたりすることが多い。そのため、脳損傷後にいち早く脳神経の再生を促進する薬物を使用することが、治療における解決手法となる。
【０００４】
上記だけでなく、治療薬の選択においては、大脳は血液脳関門を有しているため、一般的な薬物は自在に血液脳関門を通過して有効用量に達することができない。よって、脳部の疾患を治療する際には、有効薬物の投与が重要な課題となる。

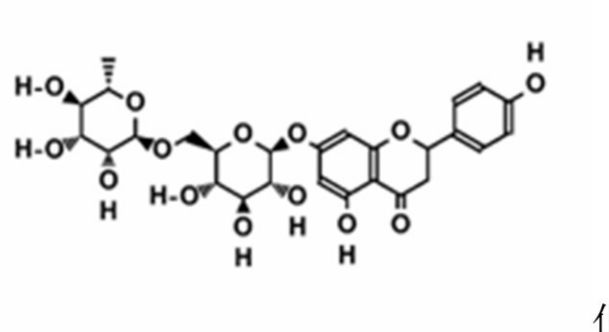
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
以上に鑑みて、現在、神経損傷を治療可能な薬物の開発が極めて必要とされているほか、血液脳関門を通過可能な投薬方式も極めて必要とされている。
【課題を解決するための手段】
【０００６】
Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ（イソロイホリン）は、現在既知の化合物であるが、当該化合物を薬物として治療を行ったとの研究は多くない。また、当該化合物を含有する組成物を静脈の問題や痔の治療に用いたとの用途は見られるが、神経関連の疾患を治療するための用途は存在しない。そこで、本発明は、更なる研究の結果、イソロイホリン及びその誘導体が神経の修復及び再生を有効に促進し得るとともに、血液脳関門を通過可能であり、外傷性脳損傷を治療するための潜在的薬物の開発に使用可能なことを発見した。
【０００７】
発明の概要は、閲覧者が本開示の内容について基本的な理解を持ち得るよう、本開示の内容のあらましを提供することを主旨としている。この発明の概要は、本開示の内容を完全にとりまとめるものではなく、本発明の実施例の重要／主要アセンブリを指摘したり、本発明の範囲を規定したりすることを意図していない。
【０００８】
人体の神経系統は中枢神経と末梢神経に分けられるが、これらはいずれもニューロンで構成される。三叉神経は、末梢神経のうちの脳神経であって、橋（中枢神経）につながっている。よって、本発明のイソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）及びその誘導体は、鼻腔粘膜を通じて嗅上皮細胞を通過し、嗅覚及び三叉神経周辺の経路に入って大脳に進入するのと同時に、末梢神経を通じて全身の神経を修復するとの効果を達成可能である。
【０００９】
以上に鑑みて、本発明では、修復が容易でない脳神経を実験対象とする。こうすることで、神経系統内の中枢神経及び末梢神経をいずれも修復可能にするとの効果が達成される。
【００１０】
「中枢神経」は脳と脊髄からなる。本発明で言うところの「中枢神経」は、嗅脳、扁桃体、海馬、新皮質、側脳室、視床上部、視床、視床下部、視床腹部、脳下垂体、松果体、第三脳室、中脳蓋、大脳脚、視蓋前野、中脳水道、橋、小脳延髄、脊髄を含むが、これらに限らない。
【００１１】
「末梢神経」は、体性神経系及び自律神経系からなる。本発明で言うところの「末梢神経」は、知覚神経、運動神経、脳神経、脊髄神経、交感神経、副交感神経、腸管神経系を含むが、これらに限らない。
【００１２】
本発明は、神経修復を促進するためのイソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）及びその誘導体の用途を提供する。
【００１３】
いくつかの実施例において、イソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）の誘導体はナリルチン（Ｎａｒｉｒｕｔｉｎ）である。
【００１４】
いくつかの実施例において、イソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）の化学構造は化学式（１）で表される。
【００１５】

【化１】



化学式 (1)

【００１６】
いくつかの実施例において、イソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）の誘導体であるナリルチン（Ｎａｒｉｒｕｔｉｎ）の化学構造は化学式（２）で表される。
【００１７】
【化２】



化学式 (2)

【００１８】
いくつかの実施例において、イソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）及びその誘導体を単独で使用した場合、損傷した海馬ニューロン（ｉｎｊｕｒｅｄ　ｈｉｐｐｏｃａｍｐａｌ　ｎｅｕｒｏｎｓ）の１０～３０％の再生を促進すること、及び、３次元の脳組織切片の神経再生を促進することが可能となる。このことは、当該化合物がニューロンの再生を有効に促進可能とし、且つ、神経損傷の修復に使用可能であることを証明している。
【００１９】
いくつかの実施例において、イソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）及びその誘導体は、その使用者の血液脳関門（ｂｌｏｏｄ－ｂｒａｉｎ　ｂａｒｒｉｅｒ）を通過して大脳に進入することで、その損傷ニューロンの修復を促進可能とする。
【００２０】
いくつかの実施例において、イソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）及びその誘導体は、血液脳関門（ｂｌｏｏｄ－ｂｒａｉｎ　ｂａｒｒｉｅｒ）を通過して大脳に進入することで、脳神経の修復、再生又は神経数の増加を促進可能とする。
【００２１】
いくつかの実施例において、イソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）及びその誘導体は、損傷した皮質ニューロン（ｃｏｒｔｉｃａｌ　ｎｅｕｒｏｎｓ）、損傷した海馬ニューロン（ｈｉｐｐｏｃａｍｐａｌ　ｎｅｕｒｏｎｓ）及び損傷した網膜ニューロン（ｒｅｔｉｎａｌ　ｎｅｕｒｏｎｓ）の再生を促進可能とする。
【００２２】

いくつかの実施例において、イソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）はＮｅｕｒｏ２ａ細胞に対する毒性が大変低い。

【００２３】

いくつかの実施例において、イソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）及びその誘導体の有効用量・濃度は１ｎＭ～８６４μＭである。

【００２４】

いくつかの実施例において、イソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）及びその誘導体は、神経修復について顕著な効果を有する。当該イソロイホリン化合物及びその誘導体は、鼻腔から投与すると、血液脳関門（ｂｌｏｏｄ－ｂｒａｉｎ　ｂａｒｒｉｅｒ）を通過して大脳に進入することで、当該損傷ニューロンの修復促進、脳神経の修復、再生又は神経数の増加促進、及び、損傷後の皮質ニューロン（ｃｏｒｔｉｃａｌ　ｎｅｕｒｏｎｓ）及び海馬ニューロン（ｈｉｐｐｏｃａｍｐａｌ　ｎｅｕｒｏｎｓ）の軸索の再生促進を可能とする。

【００２５】

以下の実施形態を参照することで、当業者は、本発明の基本的精神及びその他の発明の目的と、本発明で用いる技術手段及び実施形態を容易に理解可能となる。

【図面の簡単な説明】

【００２６】

【図１】図１は、本発明におけるインビトロ（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）での神経修復試験のフローチャートである。

【図２】図２は、本発明におけるｇａｐ　ｃｌｏｓｕｒｅ　ｒａｔｅ（隙間閉塞率）の計算の概略参考図である。

【図３Ａ】図３Ａは、本発明のイソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）によるインビトロ（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）での海馬神経修復実験の結果である。

【図３Ｂ】図３Ｂは、本発明のイソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）によるインビトロ（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）での海馬神経修復実験の結果である。

【図３Ｃ】図３Ｃは、本発明のイソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）によるインビトロ（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）での海馬神経修復実験の結果である。

【図４】図４は、本発明のイソロイホリン誘導体であるナリルチン（Ｎａｒｉｒｕｔｉｎ）によるインビトロ（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）での海馬神経再生実験の結果である。

【図５】図５は、本発明のイソロイホリン誘導体であるナリルチン（Ｎａｒｉｒｕｔｉｎ）によるインビトロ（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）での皮質神経再生実験の結果である。

【図６】図６は、本発明におけるエクスビボ（ｅｘ　ｖｉｖｏ）での脳組織切片実験のフローチャートである。

【図７】図７は、本発明のイソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）によるエクスビボ（ｅｘ　ｖｉｖｏ）での脳組織切片実験の結果である。

【図８】図８は、本発明のイソロイホリン誘導体であるナリルチン（Ｎａｒｉｒｕｔｉｎ）によるエクスビボ（ｅｘ　ｖｉｖｏ）での脳組織切片実験の結果である。

【図９】図９は、本発明のイソロイホリン化合物による細胞毒性実験の結果である。

【図１０】図１０は、本発明における制御的皮質衝撃脳外傷モデル実験のフローチャートと、イソロイホリン化合物によるマウスの脳損傷後の運動協調性回復促進実験の結果である。

【図１１】図１１は、本発明におけるエクスビボ（ｅｘ　ｖｉｖｏ）での網膜神経組織修復促進のフローチャートである。

【図１２】図１２は、本発明におけるイソロイホリンによるエクスビボ（ｅｘ　ｖｉｖｏ）での網膜神経組織修復促進実験の結果である。

【発明を実施するための形態】

【００２７】

本開示の内容の記載をより詳細且つ十分とするために、以下では、本発明の実施形態及び具体的実施例について説明的に述べる。ただし、これは本発明の具体的実施例を実施又

は運用するための唯一の形式ではない。実施形態では複数の具体的実施例の特徴と、それらの具体的実施例を操作するための方法及び用途を網羅しているが、その他の具体的実施例によっても同じ又は均等な効果を達成可能である。理解すべき点として、これらの実施例は本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を制限するものではない。

【実施例１】

【００２８】

イソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）及びその誘導体によるインビトロ（ｉｎｖｉｔｒｏ）での神経修復試験

【００２９】

図１に示すように、本実験のフローでは、妊娠１８日目のラットの胎児を取り出して、胎児の大脳を大脳皮質（ｃｏｒｔｅｘ）と海馬（ｈｉｐｐｏｃａｍｐｕｓ）に分けた。次に、大脳皮質と海馬を皮質神経細胞（ｃｏｒｔｉｃａｌ　ｎｅｕｒｏｎｓ）と海馬神経細胞（ｈｉｐｐｏｃａｍｐａｌ　ｎｅｕｒｏｎｓ）に分離したあと、海馬神経細胞を４８ウェルプレートに移した。この日をＤａｙ　Ｉｎ　Ｖｉｔｒｏ　０（ＤＩＶ０）とし、ＤＩＶ２時点でシトシンアラビノシド（Ｃｙｔｏｓｉｎｅ　ｂｅｔａ－Ｄ－ａｒａｂｉｎｏｓｉｄｅ）（ＡｒａＣ）を添加してグリア細胞（ｇｌｉａｌ　ｃｅｌｌ）の増殖を阻害した。且つ、ＤＩＶ８時点で、マイクロピペットチップを用いて神経細胞を損傷させ、異なる濃度のイソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）を添加した。そして、イソロイホリンを添加してから７２時間後に、免疫蛍光染色法を用い、ＴＵＪ１抗体で神経細胞を標識して神経再生の状況を観察した。この実験は、Ｚｅｉｓｓ　Ｏｂｓｅｒｖｅｒ　Ｚ１　ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｅで撮影した。

【００３０】

図２に示すように、隙間閉塞率（ｇａｐ　ｃｌｏｓｕｒｅ　ｒａｔｅ）から軸索の再生度合いを定量化した。白色の点線は、マイクロピペットチップで擦って神経細胞を損傷させた際に生じた境界であり、中央の黒色部分はマイクロピペットチップで擦られた領域である。再生した神経突起は、点線の両側から中央に向かって成長した。計算方法としては、損傷領域の５０μｍごとに、ｇａｐ（隙間）に線を１本引いて隙間の幅を計算し、合計１０本の線を引いたあとに、平均値である損傷境界間の隙間長（Ｌｅｎｇｔｈ　ｏｆ　ｇａｐ　ｂｅｔｗｅｅｎ　ｉｎｊｕｒｅｄ　ｂｏｒｄｅｒｓ，Ｌｇ）を求めた。また、一定時間後に、同様の損傷領域の５０μｍごとに線を１本引き、再生により延伸した軸索を結んで長さを計算した。そして、１０本の線を引いたあとに、平均値である再生神経間の隙間長（Ｌｅｎｇｔｈ　ｏｆ　ｇａｐ　ｂｅｔｗｅｅｎ　ｒｅｇｅｎｅｒａｔｅｄ　ｎｅｕｒｏｎｓ，Ｌｎ）を求め、（Ｌｇ－Ｌｎ）／Ｌｇから隙間閉塞率を計算した。なお、縮尺は１００μｍとした。この実験は、Ｚｅｉｓｓ　Ｏｂｓｅｒｖｅｒ　Ｚ１　ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｅで撮影した。

【００３１】

図３Ａ～図３Ｃに示すように、白色の点線は、マイクロピペットチップで神経細胞を損傷させることで発生した境界である。なお、縮尺は１００μｍとした。この実験は、Ｚｅｉｓｓ　Ｏｂｓｅｒｖｅｒ　Ｚ１　ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｅで撮影した。この実験より、イソロイホリンが海馬の神経突起の増殖を促進可能とすることが分かった。図３Ａは、３．５ｎＭ～３４．６ｎＭのイソロイホリンの実験結果の図であり、図３Ｂは、０．００９μＭ～８６４μＭのイソロイホリンの実験結果の図であり、図３Ｃは、異なる濃度のイソロイホリンによる隙間閉塞率の計算結果の図である。

【００３２】

イソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）の誘導体であるナリルチン（Ｎａｒｉｒｕｔｉｎ）による損傷後の海馬神経再生促進実験

【００３３】

図１に示すように、本実験のフローでも同様に、妊娠１８日目のラットの胎児を取り出して、胎児の大脳を大脳皮質と海馬に分けてから、皮質神経細胞及び海馬神経細胞に分離し、海馬神経細胞を４８ウェルプレートに移した。この日をＤａｙ　Ｉｎ　Ｖｉｔｒｏ

０（ＤＩＶ０）とし、ＤＩＶ２時点でシトシンアラビノシド（ＡｒａＣ）を添加してグリア細胞の増殖を阻害した。且つ、ＤＩＶ８時点で、マイクロピペットチップを用いて神経細胞を損傷させ、１ｎＭ及び１０ｎＭのナリルチンをそれぞれ添加した。また、０．１％ＤＭＳＯを溶媒コントロール群とした。図中の結果は、いずれも０．１％ＤＭＳＯ群に対し標準化したものである。そして、ナリルチンを添加してから７２時間後に、免疫蛍光染色法を用い、ＴＵＪ１抗体で神経細胞を標識して神経再生の状況を観察した。この実験は、Ｚｅｉｓｓ　Ｏｂｓｅｒｖｅｒ　Ｚ１　ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｅで撮影した。なお、縮尺は１００μｍとした。

【００３４】

図４に示すように、隙間閉塞率（ｇａｐ　ｃｌｏｓｕｒｅ　ｒａｔｅ）から軸索の再生度合いを定量化した。この実験結果は、ナリルチン（Ｎａｒｉｒｕｔｉｎ）が海馬の神経突起の増殖を有効に促進可能とすることを示していた。

【００３５】

イソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）の誘導体であるナリルチン（Ｎａｒｉｒｕｔｉｎ）による損傷後の皮質神経再生促進実験

【００３６】

図１に示すように、本実験のフローでも同様に、妊娠１８日目のラットの胎児を取り出して、胎児の大脳を大脳皮質と海馬に分けてから、皮質神経細胞及び海馬神経細胞に分離し、皮質神経細胞を４８ウェルプレートに移した。この日をＤａｙ　Ｉｎ　Ｖｉｔｒｏ　０（ＤＩＶ０）とし、ＤＩＶ２時点でシトシンアラビノシド（ＡｒａＣ）を添加してグリア細胞の増殖を阻害した。且つ、ＤＩＶ８時点で、マイクロピペットチップを用いて神経細胞を損傷させ、１０ｎＭ及び１００ｎＭのナリルチンをそれぞれ添加した。また、０．１％ＤＭＳＯを溶媒コントロール群とした。図中の結果は、いずれも０．１％ＤＭＳＯ群に対し標準化したものである。そして、ナリルチンを添加してから７２時間後に、免疫蛍光染色法を用い、ＴＵＪ１抗体で神経細胞を標識して神経再生の状況を観察した。この実験は、Ｚｅｉｓｓ　Ｏｂｓｅｒｖｅｒ　Ｚ１　ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｅで撮影した。なお、縮尺は１００μｍとした。

【００３７】

図５に示すように、隙間閉塞率（ｇａｐ　ｃｌｏｓｕｒｅ　ｒａｔｅ）から軸索の再生度合いを定量化した。この実験結果は、ナリルチン（Ｎａｒｉｒｕｔｉｎ）が皮質の神経突起の増殖を有効に促進可能とすることを示していた。

【実施例２】

【００３８】

イソロイホリン及びその誘導体によるエクスビボ（ｅｘ　ｖｉｖｏ）での脳組織切片実験

【００３９】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏで神経再生に対する化合物の効果をテストしたあと、ｅｘ　ｖｉｖｏ（立体）でも神経再生に対する化合物の効果を観察しようと試みた。図６に示すように、本発明では、３次元で脳組織切片を培養する方式で、神経に対する化合物の効果を観察した。実験方法としては、妊娠１８日目の雌ラットの胎児を取り、胎児の大脳を取り出したあと、低融点アガロースゲル（ｌｏｗ－ｍｅｌｔｉｎｇ　ａｇａｒｏｓｅ　ｇｅｌ）で包埋した。そして、ライカミクロトーム（Ｌｅｉｃａ　ｍｉｃｒｏｔｏｍｅ）ＶＴ１００を用いてスライスし、厚さ３５０μｍの脳切片を取得して、メスにより損傷（ｉｎｊｕｒｙ）させてから、６ウェルプレートのインサート（ｉｎｓｅｒｔ）に移した。この培養方式により、脳切片を培地（ｍｅｄｉｕｍ）と空気に同時に接触可能とした。且つ、脳切片を培養することで、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ｃｕｌｔｕｒｅ（インビトロ培養）の場合よりも、神経細胞と大脳のその他の細胞との相互作用及び立体構造を比較的リアルに反映可能となった。また、ｄｄH_2O又はイソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）を毎日添加した、そして、９６時間培養したあと、蛍光免疫染色法により、ＴＵＪ１抗体で神経細胞を標識し、ＧＦＡＰ抗体でグリア細胞を標識し、ＤＡＰＩ試薬で細胞核を標識した。

【００４０】

図７に示すように、ＴＵＪ１抗体は神経細胞を標識し、ＧＦＡＰ抗体はグリア細胞を標識し、ＤＡＰＩ試薬は細胞核を標識した。白色の点線はメスで損傷させた部位を示しており、点線の左側が脳切片組織、点線の右側が新生した軸索である。白色の点線の長さと、白線右側の新生軸索の面積を計算し、新生軸索の面積を白色の点線の長さで割って、神経突起の長さ（ｎｅｕｒｉｔｅ　ｌｅｎｇｔｈ）を計算することで、神経再生の促進におけるイソロイホリンの効果を定量化可能とした。なお、縮尺は１００μｍとした。また、この実験では、Ｚｅｉｓｓ　ＬＳＭ８００　ｃｏｎｆｏｃａｌ　ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｅを用いて撮影した。ｅｘ　ｖｉｖｏの脳切片において神経再生に対するイソロイホリンの効果を観察したところ、実験結果より、イソロイホリンが神経再生を促進する効果を有することが分かった。

【００４１】

イソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｆｏｌｉｎ）の誘導体であるナリルチン（Ｎａｒｉｒｕｔｉｎ）の実験フローでも同様に、図６に示すように、ラットの胎児の脳を取り出して、脳を低融点アガロースゲル内に包埋してから、ライカミクロトームＶＴ１００で脳を厚さ３５０μｍの切片組織にスライスした。次に、メスで脳切片を損傷させたあと培養するとともに、ｄｄH_2O又はナリルチンを毎日添加した。そして、９６時間培養したあと、蛍光免疫染色法により、ＴＵＪ１抗体で神経細胞を標識し、ＧＦＡＰ抗体でグリア細胞を標識し、ＤＡＰＩ試薬で細胞核を標識した。なお、この実験の縮尺は１００μｍとした。また、この実験では、Ｚｅｉｓｓ　ＬＳＭ８００　ｃｏｎｆｏｃａｌ　ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｅを用いて撮影した。

【００４２】

図８に示すように、ｅｘ　ｖｉｖｏ（エクスビボ）の脳切片において神経再生に対するナリルチンの効果を観察したところ、実験結果より、ナリルチンが神経再生を促進する効果を有することが分かった。

【実施例３】

【００４３】

イソロイホリンの細胞毒性実験

【００４４】

ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ　ｃｅｌｌ　ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　ａｓｓａｙを用いて、Ｎｅｕｒｏ２ａ細胞に対するイソロイホリン（Ｉｓｏｒｈｏｉｏｆｏｌｉｎ）の毒性を検査した。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ　ｃｅｌｌ　ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　ａｓｓａｙにより細胞中のＡＴＰ含有量を測定することで、化合物添加後の細胞の生存率を観察可能であった。

【００４５】

図９に示すように、結果より、Ｎｅｕｒｏ２ａ細胞に対するイソロイホリンのＩＣ５０は約１１．６１６ｍＭの範囲であり、細胞に対する毒性が大変低いことが分かった。

【実施例４】

【００４６】

イソロイホリンによるマウスの脳損傷後の運動協調性回復促進試験

【００４７】

水平棒（ｈｏｒｉｚｏｎｔａｌ　ｂａｒ）実験によって、地上から４９ｃｍに位置する長さ３８ｃｍ、直径２ｍｍ、４ｍｍ、６ｍｍの黄銅棒上にマウスを置いて、前足で黄銅棒を掴ませた。そして、黄銅棒上でのマウスの滞在時間を計算するとともに、黄銅棒末端の台上に到達したか否かより、マウスの運動協調性能力を評価した。評価基準は、１～５秒を１点、５～１０秒を２点、１０～２０秒を３点、２０～３０秒を４点、３０秒以上又は台上への到達を５点とした。

【００４８】

図１０に示すように、本実験の実験モデルについては、それぞれ、脳損傷の５日前、３日前、１日前である－５、－３、－１Ｄｐｉ（Ｄａｙ　ｐｏｓｔ　ｉｎｊｕｒｙ）時点でｐｒｅ－ｔｒａｉｎｉｎｇ（予備訓練）を行った。且つ、０Ｄｐｉ時点で、ｃｏｎｔｒｏ

ｌｌｅｄ ｃｏｒｔｉｃａｌ ｉｍｐａｃｔ ｍｏｄｅｌ（制御的皮質衝撃脳外傷モデル）によりマウスを脳損傷させ、０、２、４、６、８、１０、１２Ｄｐｉ時点で、鼻腔から投与する方式で１４μｇ／ｋｇ又は１４０μｇ／ｋｇのイソロイホリンを投与した。また、１、３、６、１０、１３Ｄｐｉ時点で水平棒実験を行った。

【００４９】

図１０から明らかなように、脳損傷後に水（ｄｄＨ$_2$Ｏ）のみを投与した群では運動協調性の喪失が見られたが、イソロイホリンを投与した群では、運動協調性がＳｈａｍ群（偽手術群）と類似しており、運動協調性の回復が明らかに促進された。

【実施例５】

【００５０】

イソロイホリンによるエクスビボ（ｅｘ ｖｉｖｏ）での網膜神経組織の修復促進

【００５１】

実験のデザイン及びフローは図１１に示す通りであった。網膜組織（ｒｅｔｉｎａｌ ｅｘｐｌａｎｔｓ）は生後８日目のＣ５７ＢＬ／６系統マウスから取り出した。殺処理後に目を取り出して、ピンセット及びマイクロ剪刀で眼球と網膜を分離するとともに、硝子体を除去した。最後に、分離した網膜を４片に分け、マイクロ剪刀で組織の辺縁を整えて損傷させた。各片は、１８ｍｍの円形ガラス上で培養してから１２ウェルプレートに投入し、インキュベーターに入れて、５％ＣＯ$_2$及び３５℃条件で５日間培養した。各網膜組織については、毎日のように新鮮な培養液に交換するとともに、９μＭ又は９０μＭのイソロイホリンを添加するものとした。そして、網膜組織を５日目まで培養した時点で、０．１％グルタルアルデヒド溶液（Ｇｌｕｔａｒａｌｄｅｈｙｄｅ ｓｏｌｕｔｉｏｎ）及び４％パラホルムアルデヒド（ｐａｒａｆｏｒｍａｌｄｅｈｙｄｅ）混合溶液を用い、室温で１時間固定（Ｆｉｘ）した。且つ、一次抗体であるａｘｏｎａｌ ｍａｒｋｅｒ ｂｅｔａ－ＩＩＩ－ｔｕｂｕｌｉｎ（ＴＵＪ１）及びＤＡＰＩを用いて染色し、神経細胞と細胞核を標識してから、超解像正立型共焦点顕微鏡（ＬＳＭ－８００，カール・ツァイス）で撮影した。そして、画像解析プログラムＩｍａｇｅＪを用い、組織境界を選択して周長及び組織外の神経繊維面積を計算した。これにより、神経繊維面積を組織境界の周長で割って、周長あたりの神経繊維長を求めた。

【００５２】

図１２に示すように、網膜ニューロン（ｒｅｔｉｎａｌ ｎｅｕｒｏｎｓ）を損傷させたあと、イソロイホリンを投与した群は、水（ｄｄＨ$_2$Ｏ）のみを投与した群に比べて明らかな損傷後回復効果を有していた。

【００５３】

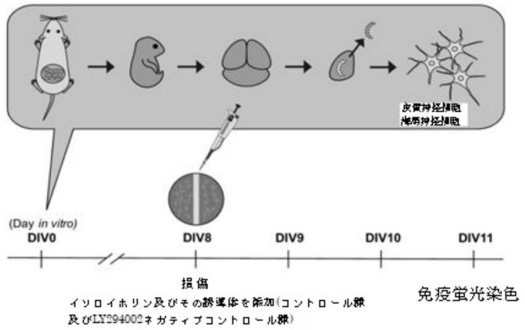
上記の実験データは、特定条件で取得した初歩的な実験結果であって、本発明の技術内容の理解又は参照を容易とするためのものにすぎず、更にその他の関連実験を行う必要がある。当該実験データ及び結果は本発明の権利範囲を制限するためのものではない。

【００５４】

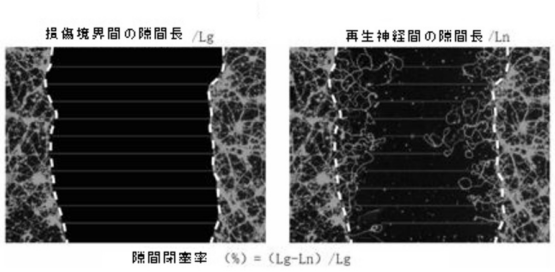
上記の好ましい実施例は、本発明とその技術的特徴を例示的に説明したものにすぎず、当該実施例の技術は、各種の実質的な等価の改変及び／又は置き換えを適切に行って実施してもよい。従って、本発明の権利範囲は請求項で規定される範囲に準じる。

【図面】

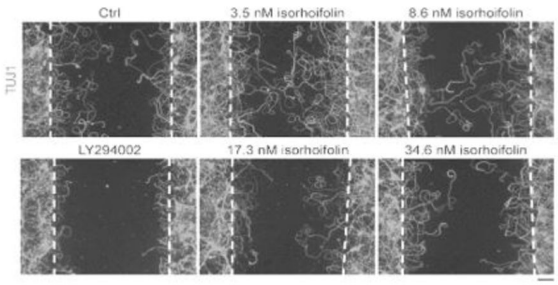
【図１】



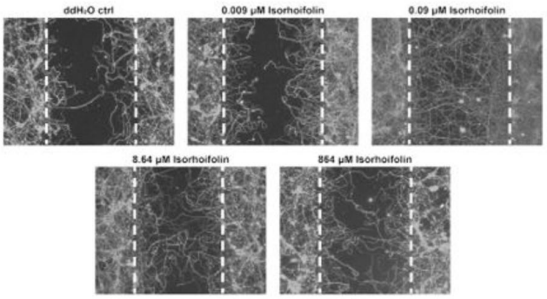
【図２】



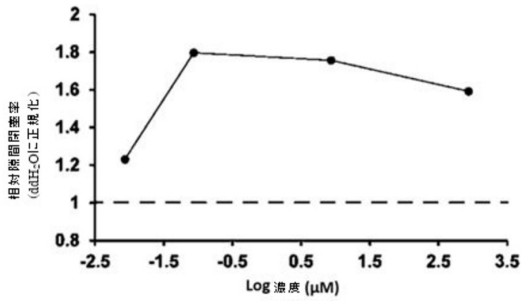
【図３Ａ】



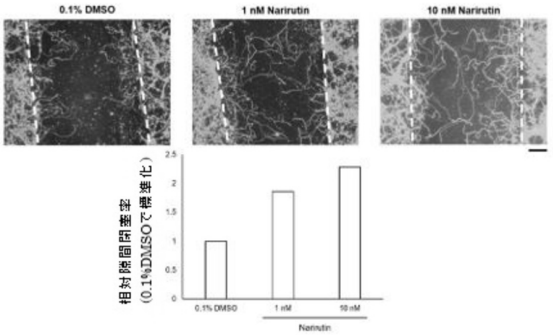
【図３Ｂ】



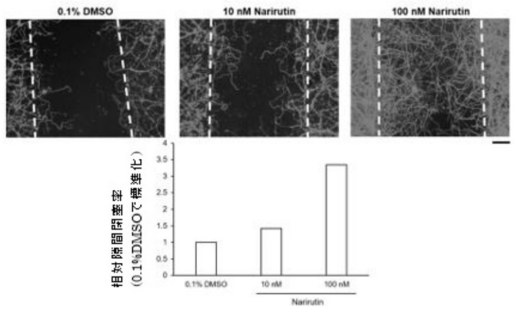
【図３Ｃ】



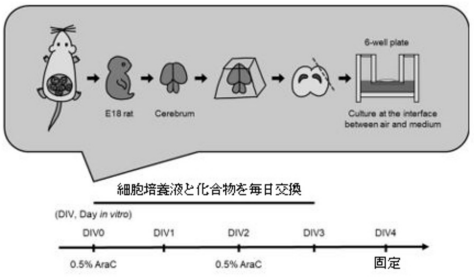
【図４】



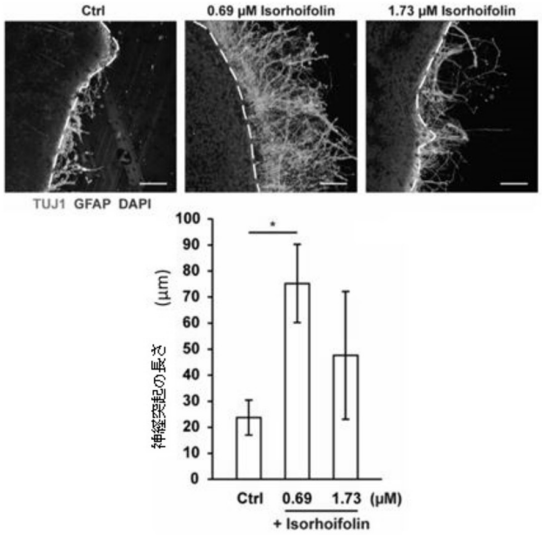
【図５】


0.1% DMSO
10 nM Narirutin
100 nM Narirutin
相対神経細胞密度
（0.1%DMSOで標準化）
0.1% DMSO
10 nM
100 nM
Narirutin

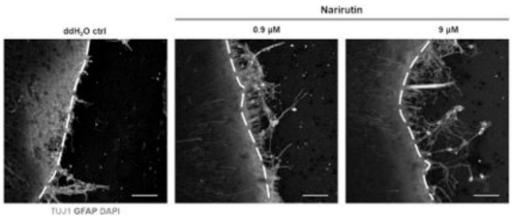
【図６】


6-well plate
E18 rat
Cerebrum
Culture at the interface between air and medium
細胞培養液と化合物を毎日交換
(DIV, Day in vitro)
DIV0
DIV1
DIV2
DIV3
DIV4
0.5% AraC
0.5% AraC
固定

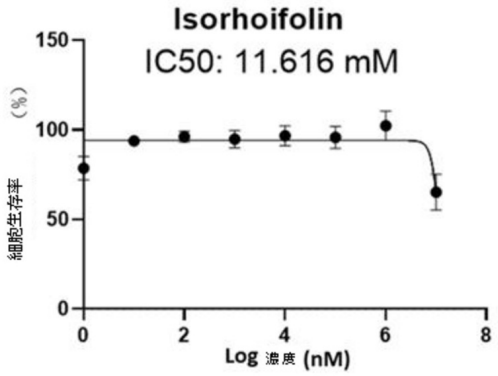
【図７】


Ctrl
0.69 μM Isorhoifolin
1.73 μM Isorhoifolin
TUJ1 GFAP DAPI
神経突起の長さ (μm)
Ctrl
0.69
1.73 (μM)
+ Isorhoifolin

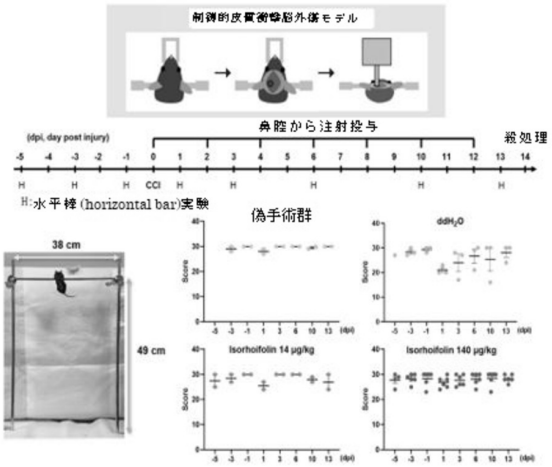
【図８】


Narirutin
ddH2O ctrl
0.9 μM
9 μM
TUJ1 GFAP DAPI

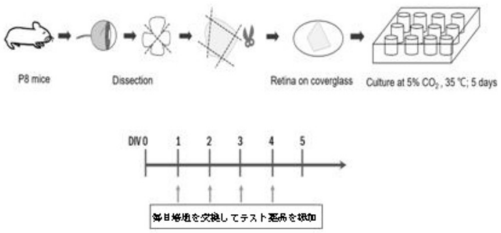
【図９】



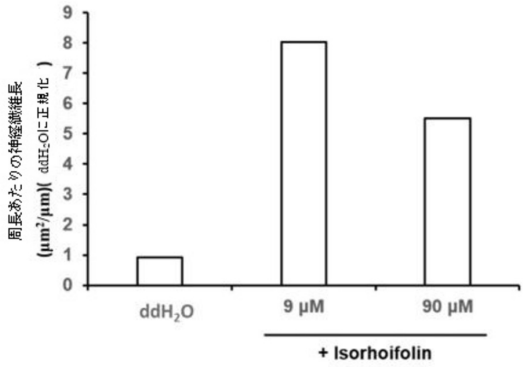
【図１０】



【図１１】



【図１２】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/127372

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H 17/06(2006.01)i; A61K 31/35(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i

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)

C07H;A61K;A61P

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

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

WPI, STN, EPODOC, CNPAT, CNKI, 万方, WANFANG, 百度学术, BAIDU SCHOLAR: 陈令仪, 陈裕仁, 王翊, 李育堂, 吕亭萱, 李家维, 陈方仪, 焦传金, 异野漆树苷, 漆树苷, 芸香苷, 柚皮苷, 橙皮苷, 鼠李糖, 芸香糖, 芹菜素, 神经元, 损伤, 海马回, 脑神经, 中枢神经, 皮质, 视网膜, 血脑屏障, isorhoifolin, narirutin, neurons, hippocampal, blood, brain, barrier, cortex, retinal, nerve, hesperidin, apigenin, rutinoside, protective, 552-57-8, 14259-46-2, 520-26-3, STN中structural formula search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	徐妍等 (XU, Yan et al.). "橙皮苷减轻鱼藤酮诱导的神经细胞损伤 (Non-official translation: Hesperidin Alleviates Rotenone-induced Nerve Cell Damage)" *中华危重症医学杂志(电子版) (Chinese Journal of Critical Care Medicine (Electronic Edition))*, Vol. 12, No. 3, 30 June 2019 (2019-06-30), pp. 182-186	1-8
X	肖博等 (XIAO, Bo et al.). "橙皮苷对糖尿病大鼠视网膜神经细胞的保护作用 (Protective Effect of Hesperidin on Retinal Nerve Cells in Diabetic Rat)" *世界最新医学信息文摘 (World Latest Medicine Information)*, Vol. 19, No. 80, 31 December 2019 (2019-12-31), pp. 26-27	1-8
X	ZENG, J. et al. "Purification of linarin and hesperidin from Mentha haplocalyx by aqueous two-phase flotation coupled with preparative HPLC and evaluation of the neuroprotective effect of linarin" *J.Sep. Sci.*, Vol. 44, No. 12, 15 April 2021 (2021-04-15), pp. 2496-2503	1-8

☑ 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
28 November 2022	**16 December 2022**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/127372

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YOKOYAMA, K. et al. "Protective effects of Choto-san and hooks and stems of Uncaria sinensis against delayed neuronal death after transient forebrain ischemia in gerbil" *Phytomedicine,* Vol. 11, 31 December 2004 (2004-12-31), pp. 478-489	1-8
A	KUO, P. et al. "Anti-Inflammatory and Neuroprotective Constituents from the Peels of Citrus grandis" *Molecules,* Vol. 22, 09 June 2017 (2017-06-09), pages 967/1-967/11	1-8
A	CN 101045072 A (HU JUN) 03 October 2007 (2007-10-03) claims 1-10	1-8

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/127372

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 101045072 A	03 October 2007	None	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/127372

A. 主题的分类

C07H 17/06(2006.01)i; A61K 31/35(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07H;A61K;A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

WPI, STN, EPODOC, CNPAT, CNKI, 万方, 百度学术, 陈令仪, 陈裕仁, 王翊, 李育堂, 吕亭萱, 李家维, 陈方仪, 焦传金, 异野漆树苷, 漆树苷, 芸香苷, 柚皮苷, 橙皮苷, 鼠李糖, 芸香糖, 芹菜素, 神经元, 损伤, 海马回, 脑神经, 中枢神经, 皮质, 视网膜, 血脑屏障, isorhoifolin, narirutin, neurons, hippocampal, blood, brain, barrier, cortex, retinal, nerve, hesperidin, apigenin, rutinoside, protective, 552-57-8, 14259-46-2, 520-26-3, STN中结构式检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	徐妍等. "橙皮苷减轻鱼藤酮诱导的神经细胞损伤" 中华危重症医学杂志（电子版），第12卷，第3期，2019年6月30日 (2019-06-30)， 第182-186页	1-8
X	肖博等. "橙皮苷对糖尿病大鼠视网膜神经细胞的保护作用" 世界最新医学信息文摘，第19卷，第80期，2019年12月31日 (2019-12-31)， 第26-27页	1-8
X	ZENG, J.等. "Purification of linarin and hesperidin from Mentha haplocalyx by aqueous two-phase flotation coupled with preparative HPLC and evaluation of the neuroprotective effect of linarin" J.Sep. Sci.，第44卷，第12期，2021年4月15日 (2021-04-15)， 第2496-2503页	1-8
A	YOKOYAMA, K.等. "Protective effects of Choto-san and hooks and stems of Uncaria sinensis against delayed neuronal death after transient forebrain ischemia in gerbil" Phytomedicine，第11卷，2004年12月31日 (2004-12-31)， 第478-489页	1-8

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：
"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件
"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利
"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）
"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件
"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件
"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性
"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2022年11月28日	2022年12月16日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 李伟 电话号码 86-(010)-53962165

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/127372

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	KUO, P.等. "Anti-Inflammatory and Neuroprotective Constituents from the Peels of Citrus grandis" Molecules, 第22卷，2017年6月9日 (2017-06-09), 第967/1-967/11页	1-8
A	CN 101045072 A (胡军) 2007年10月3日 (2007-10-03) 权利要求1-10	1-8

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/127372

检索报告引用的专利文件	公布日（年/月/日）	同族专利	公布日（年/月/日）
CN 101045072 A	2007年10月3日	无	

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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,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,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者　陳裕仁
台湾　３００１３　新竹市光復路二段１０１号
(72)発明者　廖▲ぶん▼玲
台湾　３００１３　新竹市光復路二段１０１号
(72)発明者　王翊
台湾　３００１３　新竹市光復路二段１０１号
(72)発明者　李育棠
台湾　３００１３　新竹市光復路二段１０１号
(72)発明者　呂亭萱
台湾　３００１３　新竹市光復路二段１０１号
(72)発明者　李家維
台湾　３００１３　新竹市光復路二段１０１号
(72)発明者　陳方儀
台湾　３００１３　新竹市光復路二段１０１号
(72)発明者　焦伝金
台湾　３００１３　新竹市光復路二段１０１号

Ｆターム（参考）　4C086　AA01 AA02 EA11 MA01 MA04 MA59 NA14 ZA02 ZA20 ZB26