

(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1月12日(12.01.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/006407 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 36/19 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
A61K 31/222 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2015/069363

(22) 国際出願日:

2015年7月4日(04.07.2015)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(71) 出願人: 株式会社 A O B 慧央グループ (AOB KEIOH GROUP CORP.) [JP/JP]; 〒4088522 山梨県北杜市小淵沢町2961番地 Yamanashi (JP).

(72) 発明者: 高橋 知也 (TAKAHASHI, Tomoya); 〒4088522 山梨県北杜市小淵沢町2961番地 株式会社 A O B 慧央グループ内 Yamanashi (JP). 潘 一紅 (PAN, I-Horng); 30011 新竹市光復路二段321号 工業技術研究院内 Hsinchu (TW). ▲溫▼淑芳 (WEN, Shu-Fang); 30011 新竹市光復路二段321号 工業技術研究院内 Hsinchu (TW). 呂亦晃 (LU, I-Huang); 30011 新竹市光復路二段32

1号 工業技術研究院内 Hsinchu (TW). ▲莊▼凱安 (CHUANG, Kai-An); 30011 新竹市光復路二段321号 工業技術研究院内 Hsinchu (TW).

(74) 代理人: 松尾 誠剛 (MATSUO, Nobutaka); 〒3990214 長野県諏訪郡富士見町落合9862番地60 めぶき特許事務所 Nagano (JP).

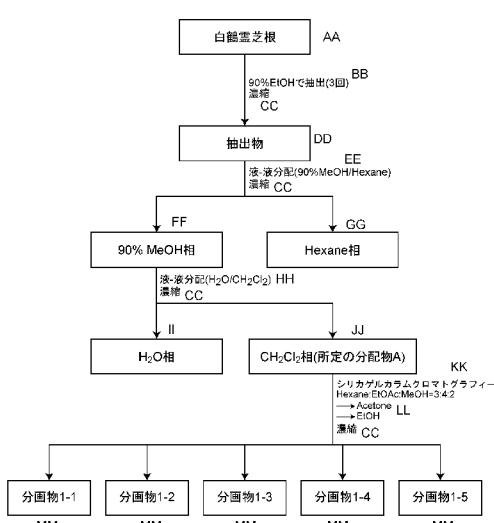
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, 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

[続葉有]

(54) Title: NERVE CELL DEATH INHIBITOR, ANTI-ALZHEIMER'S DISEASE AGENT, BRAIN HYPOFUNCTION INHIBITOR, DRUG OR FOOD HAVING ANTI-ALZHEIMER'S DISEASE EFFECT OR BRAIN HYPOFUNCTION-INHIBITING EFFECT, AND METHOD FOR PRODUCING NERVE CELL DEATH INHIBITOR

(54) 発明の名称: 神経細胞死抑制剤、抗アルツハイマー病剤、抗脳機能低下剤、抗アルツハイマー病作用又は抗脳機能低下作用を有する医薬品又は食品及び神経細胞死抑制剤の製造方法



(57) Abstract: A nerve cell death inhibitor, an anti-Alzheimer's disease agent, a brain hypofunction inhibitor and a drug or food having an anti-Alzheimer's disease effect or a brain hypofunction-inhibiting effect, each containing as an active ingredient "a preset partitioned portion that is a portion partitioned in methylene dichloride when an ethanol extract of *Rhinacanthus nasuta* (L.) Kurz is liquid-liquid partitioned with hexane and methanol and then the portion partitioned in methanol is liquid-liquid partitioned with methylene dichloride and water", "a preset fraction that is a fraction eluted from a silica gel column with an elution solvent, said elution solvent consisting of n-hexane, ethyl acetate and anhydrous methanol, when the preset partitioned portion is subjected to silica gel column chromatography using the elution solvent" or Rhinacanthin C. According to the present invention, a nerve cell death inhibitor having an excellent effect of inhibiting nerve cell death, an anti-Alzheimer's disease agent, a brain hypofunction inhibitor and a drug or food having an anti-Alzheimer's disease effect or a brain hypofunction-inhibiting effect can be provided.

(57) 要約:

[続葉有]

AA *Rhinacanthus nasuta* (L.) Kurz root
BB Extraction with 90% EtOH (thrice)
CC Concentration
DD Extract
EE Liquid-liquid partition (90% MeOH/Hexane)
FF 90% MeOH phase
GG Hexane phase
HH Liquid-liquid partition (H_2O/CH_2Cl_2)
II H_2O phase
JJ CH_2Cl_2 phase (preset partitioned portion A)
KK Silica gel column chromatography Hexane:EtOAc:MeOH=3:4:2
LL Acetone
MM Fraction

WO 2017/006407 A1



ロツバ[®] (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)）

「白鶴靈芝のエタノール抽出物をヘキサン及びメタノールで液一液分配し、メタノールに分配される分配物を二塩化メチレン及び水で液一液分配したとき、二塩化メチレンに分配される所定の分配物」、「所定の分配物を n-ヘキサン、酢酸エチル及び無水メタノールから構成される溶出溶媒を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付すとき、シリカゲルカラムから溶出溶媒により溶出される分画物である所定の分画物」又はリナカンチン C を有効成分として含有する神経細胞死抑制剤、抗アルツハイマー病剤、抗脳機能低下剤、及び、抗アルツハイマー病作用又は抗脳機能低下作用を有する医薬品又は食品。本発明によれば、優れた神経細胞死抑制作用を有する神経細胞死抑制剤、抗アルツハイマー病剤、抗脳機能低下剤及び抗アルツハイマー病作用又は抗脳機能低下作用を有する医薬品又は食品を提供可能となる。

明 細 書

発明の名称 :

神経細胞死抑制剤、抗アルツハイマー病剤、抗脳機能低下剤、抗アルツハイマー病作用又は抗脳機能低下作用を有する医薬品又は食品及び神経細胞死抑制剤の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、神経細胞死抑制剤、抗アルツハイマー病剤、抗脳機能低下剤、抗アルツハイマー病作用又は抗脳機能低下作用を有する医薬品又は食品及び神経細胞死抑制剤の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、我が国の急激な高齢化に伴い、認知症の患者が増加している。認知症の患者数は、認知症に対する画期的な予防法及び治療法が確立されない限り、今後も増え続けると予想されている。このため、医学的な観点だけではなく、行政の観点からも認知症の予防法及び治療法が希求されている。

[0003] ところで、認知症の原因となる疾患には様々なものがあるが、アルツハイマー病（アルツハイマー型認知症）、レビー小体型認知症及び脳血管性認知症の三種類がその多くを占めているとされる。その中でもアルツハイマー病は患者数が多く、かつ、根本的な予防法及び治療法が確立されていないため、現在もアルツハイマー病について様々な研究が行われている。

[0004] アルツハイマー病のメカニズムとしては、アミロイドカスケード仮説が広く支持されている。アミロイドカスケード仮説とは、脳にアミロイドタンパク質であるアミロイド β が蓄積し、その結果、アルツハイマー神経原線維変化、直接的又は間接的な毒性による神経細胞の死滅や脱落等が発生し、それに伴って認知症の諸症状が発生するという仮説である。当該仮説は現在のところ広く支持されており、予防法及び治療法の開発研究における指針となっている（例えば、非特許文献1参照。）。

[0005] 従来、アルツハイマー病の治療には、ドネペジル、ガランタミン、リバス

チグミン等が用いられている（例えば、非特許文献2参照。）。上記のような物質を有効成分として含有する抗アルツハイマー病剤によれば、認知症の症状の進行を抑制することが可能となる。

[0006] ところで、白鶴靈芝 (*Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz)。白鶴靈芝草ともいう。は、インド南部デカン高原の原産とされるリナカンサス属キツネノマゴ科に属する常緑小低木である。白鶴靈芝の全草は驅虫、消炎、皮膚真菌に対する抗菌作用があることが知られ（例えば、非特許文献3参照。）、主に中国、台湾等において、また、最近では日本国において漢方薬や食品として用いられている。その他、本出願人による以前の出願で、白鶴靈芝に活性酸素消去能があること（例えば、特許文献1参照。）、排泄促進作用があること（例えば、特許文献2参照。）、抗アレルギー作用があること（例えば、特許文献3参照。）及び抗腫瘍作用があること（例えば、特許文献4参照。）等が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開平9-143091号公報

特許文献2：特開平9-169662号公報

特許文献3：特開2001-10964号公報

特許文献4：特開2002-53481号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：実験医学、Vol. 26 No. 16、2008年10月号、2550頁、羊土社、2008年10月1日発行

非特許文献2：認知症の最新医療、Vol. 4 No. 2、2014年4月号、58～63頁、フジメディカル出版、2014年4月25日発行

非特許文献3：原色牧野和漢薬草大図鑑、492頁、北隆館、1988年

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] しかしながら、白鶴靈芝の抽出物から所定の方法により得られる所定の分配物、所定の分画物又は白鶴靈芝に含有されるリナカンチンCがアミロイド β の毒性に対する神経細胞死抑制作用を有することは知られていない。

[0010] そこで、本発明は、優れた神経細胞死抑制作用を有する神経細胞死抑制剤、抗アルツハイマー病剤、抗脳機能低下剤及び抗アルツハイマー病作用又は抗脳機能低下作用を有する医薬品又は食品を提供することを目的とする。また、優れた神経細胞死抑制作用を有する神経細胞死抑制剤を製造することが可能な神経細胞死抑制剤の製造方法を提供することも目的とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、アルツハイマー病の予防又は治療に用いることが可能であると考えられるものの1つである、アミロイド β の直接毒性に対する神経細胞死抑制作用を有するものについて鋭意研究を行った結果、白鶴靈芝の抽出物から所定の方法により得られる所定の分配物又は所定の分画物、及び、白鶴靈芝に含有されるリナカンチンCに神経細胞死抑制作用があることを見出し、本発明を完成させるに至った。本発明は、下記の事項により構成される。

なお、以下の説明において特段の記載がなければ、溶媒の比率は体積で示している。

[0012] [1] 白鶴靈芝のエタノール抽出物をヘキサン及びメタノールで液一液分配し、前記メタノールに分配される分配物を二塩化メチレン及び水で液一液分配するとき、前記二塩化メチレンに分配される分配物である所定の分配物のみを有効成分として含有する神経細胞死抑制剤。

[0013] [2] 白鶴靈芝のエタノール抽出物をヘキサン及びメタノールで液一液分配し、前記メタノールに分配される分配物を二塩化メチレン及び水で液一液分配し、前記二塩化メチレンに分配される分配物をn-ヘキサン、酢酸エチル及び無水メタノールから構成される溶出溶媒を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付すとき、

シリカゲルカラムから前記溶出溶媒により溶出される分画物である所定の

分画物のみを有効成分として含有する神経細胞死抑制剤。

- [0014] [3] 上記[2]に記載の神経細胞死抑制剤において、前記溶出溶媒は、n-ヘキサン：酢酸エチル：無水メタノール=3：4：2の比率からなる溶出溶媒である神経細胞死抑制剤。
- [0015] [4] 上記[3]に記載の神経細胞死抑制剤において、前記所定の分画物は、前記シリカゲルカラムクロマトグラフィーに用いるシリカゲルの体積に対して0.1倍～4倍の体積の前記溶出溶媒を用いたときに溶出する分画物である神経細胞死抑制剤。
- [0016] [5] 上記[4]に記載の神経細胞死抑制剤において、前記所定の分画物は、前記シリカゲルカラムクロマトグラフィーに用いる前記シリカゲルの体積に対して0.2倍～2.5倍の体積の前記溶出溶媒を用いたときに溶出する分画物である神経細胞死抑制剤。
- [0017] [6] リナカンチンCのみを有効成分として含有する神経細胞死抑制剤。
- [0018] [7] 上記[1]～[6]のいずれかに記載の神経細胞死抑制剤を有効成分として含有する抗アルツハイマー病剤。
- [0019] [8] 上記[1]～[6]のいずれかに記載の神経細胞死抑制剤を有効成分として含有する抗脳機能低下剤。
- [0020] [9] 上記[7]に記載の抗アルツハイマー病剤又は上記[8]に記載の抗脳機能低下剤を含有し、抗アルツハイマー病作用又は抗脳機能低下作用を有する医薬品又は食品。
- [0021] [10] 白鶴靈芝をエタノールで抽出してエタノール抽出物を得る第1工程と、前記エタノール抽出物をヘキサン及びメタノールで液一液分配し、前記メタノールに分配される分配物を得る第2工程と、前記メタノールに分配される分配物を二塩化メチレン及び水で液一液分配し、前記二塩化メチレンに分配される分配物である所定の分配物を得る第3工程とをこの順序で含む、前記所定の分配物のみを有効成分として含有する神経細胞死抑制剤の製造方法。
- [0022] [11] 白鶴靈芝をエタノールで抽出してエタノール抽出物を得る第1工程

と、前記エタノール抽出物をヘキサン及びメタノールで液一液分配して、前記メタノールに分配される分配物を得る第2工程と、前記メタノールに分配される分配物を二塩化メチレン及び水で液一液分配して、前記二塩化メチレンに分配される分配物を得る第3工程と、前記二塩化メチレンに分配される分配物をn-ヘキサン、酢酸エチル及び無水メタノールから構成される溶出溶媒を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付して、シリカゲルカラムから前記溶出溶媒により溶出される分画物である所定の分画物を得る第4工程とをこの順序で含む、前記所定の分画物のみを有効成分として含有する神経細胞死抑制剤の製造方法。

発明の効果

[0023] 本発明によれば、後述する試験例からもわかるように、優れた神経細胞死抑制作用を有する神経細胞死抑制剤、抗アルツハイマー病剤、抗脳機能低下剤、抗アルツハイマー病作用又は抗脳機能低下作用を有する医薬品又は食品を提供することができる。

また、本発明によれば、優れた神経細胞死抑制作用を有する神経細胞死抑制剤の製造方法を提供することが可能となる。

[0024] なお、上記〔1〕については、例えば、「以下の所定の分配物のみを有効成分として含有する神経細胞死抑制剤を製造するための、前記所定の分配物の有効成分としての使用であって、白鶴靈芝のエタノール抽出物をヘキサン及びメタノールで液一液分配し、前記メタノールに分配される分配物を二塩化メチレン及び水で液一液分配するとき、前記二塩化メチレンに分配される分配物である前記所定の分配物。」のように表現することもできる。

また、上記〔2〕については、例えば、「以下の所定の分画物のみを有効成分として含有する神経細胞死抑制剤を製造するための、前記所定の分画物の有効成分としての使用であって、白鶴靈芝のエタノール抽出物をヘキサン及びメタノールで液一液分配し、前記メタノールに分配される分配物を二塩化メチレン及び水で液一液分配し、前記二塩化メチレンに分配される分配物をn-ヘキサン、酢酸エチル及び無水メタノールから構成される溶出溶媒を

用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付すとき、シリカゲルカラムから前記溶出溶媒により溶出される分画物である前記所定の分画物。」のように表現することもできる。

また、上記〔6〕については、例えば、「リナカンチンCのみを有効成分として含有する神経細胞死抑制剤を製造するための、前記リナカンチンCの有効成分としての使用。」のように表現することもできる。

また、上記〔7〕については、例えば、「抗アルツハイマー病剤を製造するための、上記〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の神経細胞死抑制剤の有効成分としての使用。」のように表現することもできる。

また、上記〔8〕については、例えば、「抗脳機能低下剤を製造するための、上記〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の神経細胞死抑制剤の有効成分としての使用。」のように表現することもできる。

また、上記〔9〕については、例えば、「抗アルツハイマー病作用又は抗脳機能低下作用を有する医薬品又は食品を製造するための、上記〔7〕に記載の抗アルツハイマー病剤又は上記〔8〕に記載の抗脳機能低下剤の有効成分としての使用。」のように表現することもできる。

図面の簡単な説明

[0025] [図1]白鶴靈芝から所定の分配物及び所定の分画物を分配・分画した手順を示すフローチャートである。

[図2]白鶴靈芝からリナカンチンCを単離した手順を示すフローチャートである。

[図3]試験例の結果を示す表である。

発明を実施するための形態

[0026] 以下、本発明の神経細胞死抑制剤、抗アルツハイマー病剤、抗脳機能低下剤、抗アルツハイマー病作用又は抗脳機能低下作用を有する医薬品又は食品及び神経細胞死抑制剤の製造方法について説明する。

[0027] 本発明の「白鶴靈芝のエタノール抽出物をヘキサン及びメタノールで液一液分配し、メタノールに分配される分配物を二塩化メチレン及び水で液一液

分配するとき、二塩化メチレンに分配される分配物である所定の分配物のみを有効成分として含有する神経細胞死抑制剤」は、本発明の「白鶴靈芝をエタノールで抽出してエタノール抽出物を得る第1工程と、エタノール抽出物をヘキサン及びメタノールで液一液分配し、前記メタノールに分配される分配物を得る第2工程と、メタノールに分配される分配物を二塩化メチレン及び水で液一液分配し、前記二塩化メチレンに分配される分配物である所定の分配物を得る第3工程とをこの順序で含む、所定の分配物のみを有効成分として含有する神経細胞死抑制剤の製造方法」により得ることができる。

[0028] 本発明における所定の分配物は、記載された条件を満たす限り種々の条件で得ることができる。以下、用いることができる方法等について説明する。

なお、本明細書において「分配物」とは、精製物であって液一液分配により得られるものることをいう。

また、本明細書において「所定の分配物のみを有効成分として含有する」とは、神経細胞死抑制作用を有する有効成分として所定の分配物のみを含有することをいい、有効成分ではない成分（各種溶媒や補助的な添加剤等）を含有することを否定しない。

[0029] 白鶴靈芝については、原料である白鶴靈芝の葉、茎、根、花等を、適当な時期に採取した後、そのままのもの、又は、通常通風乾燥等の乾燥工程に付し、抽出原料としたものを用いることができる。抽出原料としての白鶴靈芝は、粉碎若しくは細切して用いることが好ましい。

[0030] エタノールによる抽出は、白鶴靈芝及びエタノールを用いる限り、通常工業的・実験的に用いられる公知の抽出方法（例えば、「ファイトメディシン、第16巻、929～934ページ、2009年」を参照。）により行うことができる。当該抽出により、白鶴靈芝のエタノール抽出物を得ることができる。

[0031] なお、本明細書において単に「エタノール」という場合には、「エタノールを主成分とする（エタノールを50%以上含有する）溶媒」のことをいう。つまり、「エタノール」には、いわゆる無水エタノールだけではなく、エ

タノールと他の溶媒との混合溶媒も含む。白鶴靈芝から抽出を行うときには、エタノールと水との混合溶媒（含水エタノール）を用いることが好ましく、特に90%エタノールを用いることが一層好ましい。

抽出温度は、通常0～100℃、好ましくは5～50℃である。溶媒が沸騰するような条件で抽出を行う場合には、溶媒を還流させながら抽出を行うことが好ましい。抽出時間は、1時間～10日間程度であり、溶媒量は、乾燥原料あたり1回ごとに通常1～30倍重量、好ましくは5～10倍重量である。抽出操作は、攪拌であっても単なる浸漬であってもよい。抽出操作は、必要に応じて複数回繰り返してもよい。また、条件が異なる抽出操作を組み合わせてもよい。

さらに、上記の操作で得られた粗抽出液から不溶性残渣を濾過若しくは遠心分離により取り除く操作を行うことが好ましい。

[0032] 液一液分配についても、通常工業的・実験的に用いられる公知の方法により行うことができる。

液一液分配とは、二相分配、二相溶媒分配法、液一液抽出等ともいわれる方法であり、極性が異なる2種の溶媒を用い、溶解度の差により目的化合物を回収する方法である。

液一液分配の後には、溶媒を除去して乾固した状態の分配物を得ることが好ましい。ただし、溶媒の除去が使用目的上不要である場合にはこの限りではない。

[0033] なお、本明細書において単に「メタノール」という場合には、「メタノールを主成分とする（メタノールを50%以上含有する）溶媒」のことをいう。つまり、「メタノール」には、いわゆる無水メタノールだけではなく、メタノールと他の溶媒との混合溶媒も含む。液一液分配を行うときには、メタノールと水との混合溶媒、特に90%メタノールを用いることが好ましい。一方、本明細書において「無水メタノール」という場合には、無水メタノールのことをいい、メタノールを含む混合溶媒は含まない。

所定の分配物のみを有効成分として含有する神経細胞死抑制剤の製造方法」

により得ることができる。

[0034] また、本発明の「白鶴靈芝のエタノール抽出物をヘキサン及びメタノールで液一液分配し、メタノールに分配される分配物を二塩化メチレン及び水で液一液分配し、二塩化メチレンに分配される分配物をn-ヘキサン、酢酸エチル及び無水メタノールから構成される溶出溶媒を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付すとき、シリカゲルカラムから溶出溶媒により溶出される分画物である所定の分画物のみを有効成分として含有する神経細胞死抑制剤」は「白鶴靈芝をエタノールで抽出してエタノール抽出物を得る第1工程と、エタノール抽出物をヘキサン及びメタノールで液一液分配して、前記メタノールに分配される分配物を得る第2工程と、メタノールに分配される分配物を二塩化メチレン及び水で液一液分配して、前記二塩化メチレンに分配される分配物を得る第3工程と、二塩化メチレンに分配される分配物をn-ヘキサン、酢酸エチル及び無水メタノールから構成される溶出溶媒を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付して、シリカゲルカラムから前記溶出溶媒により溶出される分画物である所定の分画物を得る第4工程とをこの順序で含む、前記所定の分画物を有効成分として含有する神経細胞死抑制剤の製造方法」により得ることができる。

[0035] 本発明における所定の分画物は、記載された条件を満たす限り種々の条件で得ることができる。以下、用いることができる方法等について説明する。

なお、本明細書において「分画物」とは、精製物であってカラムクロマトグラフィーでの分画により得られるものることをいう。

また、本明細書において「所定の分画物のみを有効成分として含有する」とは、神経細胞死抑制作用を有する有効成分として所定の分画物のみを含有することをいい、有効成分ではない成分（各種溶媒や補助的な添加剤等）を含有することを否定しない。

抽出及び液一液分配については既に説明したので、再度の説明は省略する。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーの後には、溶出溶媒を除去して乾固

した状態の分画物を得ることが好ましい。ただし、溶媒の除去が使用目的上不要である場合にはこの限りではない。

[0036] シリカゲルカラムクロマトグラフィーについても、通常工業的・実験的に用いられる公知の方法により行うことができる。

溶出溶媒は、n-ヘキサン：酢酸エチル：無水メタノール=3：4：2の比率からなる溶出溶媒であることが好ましい（後述の実験例参照。）。この場合、所定の分画物は、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに用いるシリカゲルの体積に対して0.1倍～4倍の体積の溶出溶媒を用いたときに溶出する分画物であることが一層好ましく、0.2倍～2.5倍の体積の溶出溶媒を用いたときに溶出する分画物であることがより一層好ましい（後述の試験例参照。）。

[0037] 所定の分配物及び所定の分画物は、本発明の目的を損なわない限り、上記以外の精製方法をさらに行って得たものであってもよい。

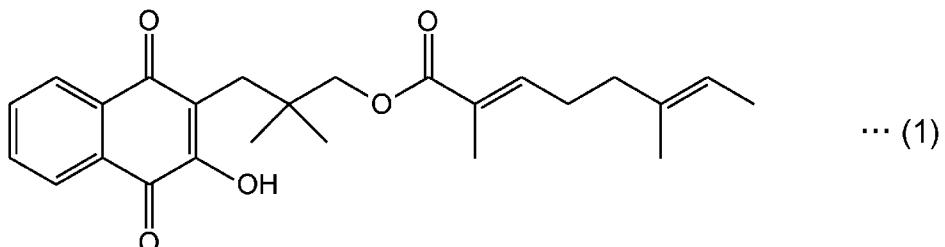
[0038] 所定の分配物及び所定の分画物を得るために用いる溶媒及び混合溶媒は、同程度の極性を有する溶媒又は混合溶媒により代替可能であると考えられる。この場合、溶媒として使用可能なものであれば所定の分配物及び所定の分画物を得るために用いることができる。溶媒の例として、水、各種アルコール類、酢酸エチルのようなエステル類、直鎖状・分枝状・環状の各種炭化水素類、二塩化メチレン（ジクロロメタン）、クロロホルム、アセトン、各種エーテル類等を挙げることができ、使用可能な溶媒の中から、方法及び目的に合致するものを用いることができる。

[0039] なお、後述する実験例の結果から考えると、本発明における所定の分配物及び所定の分画物には、1成分としてリナカンチンCが含有されていると考えられる。

[0040] 本発明の「リナカンチンCのみを有効成分として含有する神経細胞死抑制剤」におけるリナカンチンCは、白鶴靈芝を原料に抽出・精製することにより得てもよい（後述する実験例を参照。）し、その他の植物体から得てもよい。また、リナカンチンCは、合成によって得てもよい。

リナカンチンCとは、以下の化学式（1）により表される化合物である。

[化1]



[0041] 本発明のリナカンチンCは、体内の作用機序においてリナカンチンCであればよく、投与前においては、薬学上許容される塩の形態をとってもよい。

[0042] 所定の分配物、所定の分画物及びリナカンチンCは、後述する実験例に示すように、アミロイド β の毒性による神経細胞死を抑制する効果がある。このため、これらを有効成分とする本発明の神経細胞死抑制剤は、抗アルツハイマー病剤及び抗脳機能低下剤としての作用を有すると考えられる。

なお、本明細書における「抗アルツハイマー病剤」とは、アルツハイマー病の予防及び治療のうち少なくとも一方に用いることができるものである。また、「抗脳機能低下剤」とは、脳機能の低下の予防及び治療のうち少なくとも一方に用いることができるものである。

[0043] 本発明の神経細胞死抑制剤、抗脳機能低下剤、抗アルツハイマー病剤及び医薬品（ここでは、内用又は内服の医薬品）の投与経路は特に限定されないが、例えば、経口投与・直腸内投与等の経腸投与、経鼻投与などの粘膜投与、静脈内投与・皮下投与などの注射投与等を挙げることができる。剤型としては、いずれも投与方法に適した製剤の形態をとることができ、例えば、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、粉末、丸剤、トローチ剤等の固形剤、溶液、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、注射剤などの液剤、ゲル状の製剤等を挙げができる。本発明の神経細胞死抑制剤、抗脳機能低下剤、抗アルツハイマー病剤及び医薬品は、そのまま投与してもよいが、薬理的に許容される賦形剤とともに投与しても良い。賦形剤としては、单糖類、二糖類、多糖類、無機塩類、油脂、蒸留水など、製剤として一般に使用可能なもので

あればいずれも用いることができる。製剤化する際には、結合剤、滑沢剤、分散剤、懸濁剤、乳化剤、希釈剤、緩衝剤、抗酸化剤、細菌抑制剤等の添加剤を用いることもできる。

[0044] 本発明の神経細胞死抑制剤、抗脳機能低下剤、抗アルツハイマー病剤及び医薬品の有効投与量は、投与経路、剤形、疾患の症状、対象者の年齢等により異なるが、所定の分配物、所定の分画物又はリナカンチンCについて、通常成人一日あたり0.1～1000mg、好ましくは0.5～300mg、さらに好ましくは1～100mgであると考えられる。所定の分配物、所定の分画物又はリナカンチンCの含有量は、製剤の形態・有効投与量・製剤としての投与量のデータに基づき、各投与形態に最適な製剤中の有効成分含有量を設定することができる。

[0045] 本発明の医薬品は、外用医薬品であってもよい。外用医薬品の形態は、特に限定されない。

外用医薬品の形態としては、例えば、軟膏剤、クリーム剤、発布剤、テープ剤、外用剤等を挙げることができる。本発明の外用医薬品は、所定の分配物、所定の分画物又はリナカンチンCに、必要に応じて種々の医薬成分を含有することができる。また、結合剤、分散剤、懸濁剤、乳化剤、希釈剤、緩衝剤、抗酸化剤、細菌抑制剤等の添加剤を用いることもできる。

[0046] 本発明の食品としては、有効成分を加えたお茶としての形態の食品や、有効成分を配合した加工食品としての形態の食品を例示することができる。

[0047] お茶としては、白鶴靈芝の葉・茎若しくは根の乾燥物と混合して、又は、他の茶原料と混合して用いることが好ましい。茶原料としては、緑茶、ウーロン茶、プーアル茶、紅茶、ほうじ茶、玄米茶、杜仲茶、柿の葉茶、桑の葉茶等、通常お茶として用いられるものであれば、どのようなものでも用いることができる。なお、白鶴靈芝の葉・茎または根の乾燥物は、他の茶原料と同様に焙煎して用いることもできる。

[0048] 有効成分を配合した食品の形態としては、ドリンク剤、ゼリー、ビスケット、錠剤、丸剤、ソフトカプセル剤、ハードカプセル剤、散剤、細粒剤、顆

粒剤等、通常食品として提供可能な形態であれば、いずれの形態も用いることができる。また、食品の副原料として、賦形剤、結合剤、滑沢剤、分散剤、懸濁剤、乳化剤、希釈剤、緩衝剤、抗酸化剤、細菌抑制剤等の添加剤を用いることもできる。

[0049] 本発明の食品の有効摂取量は、摂取形態、対象者の健康状態、対象者の年齢等により異なるが、所定の分配物、所定の分画物又はリナカンチンCについて、通常成人一日あたり0.1～1000mg、好ましくは0.5～300mg、さらに好ましくは1～100mgであると考えられる。

[0050] 本発明の食品中の所定の分配物、所定の分画物又はリナカンチンCの含有量は、食品の形態によっても異なるが、通常0.0001～1wt%、好ましくは0.001～0.5wt%、より好ましくは、0.01～0.1wt%であると考えられる。

[0051] [実験例]

以下、所定の分配物、所定の分画物及びリナカンチンCの分配・分画・単離例や神経細胞死抑制作用に関する試験例により本発明をさらに詳しく説明する。なお、以下の実験例はいわば具体例であり、本発明は以下の実験例に制約されるものではない。

[0052] 1. 本発明の分配物、本発明の分画物及びリナカンチンCの分配・分画・単離例

本発明の分配物及び本発明の分画物の分配・分画は、図1に示すフローに沿って行った。

まず、原料として白鶴靈芝 (*Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz) の根の乾燥物2kgを準備し、汎用のグラインダーで粉碎した。

続いて、90%エタノールによる抽出を行った。抽出は、白鶴靈芝を20Lの90%エタノールに3日間浸漬し、その後、溶媒を1時間還流させることで行った。抽出液と抽出残渣とは、濾紙により分離した。当該抽出を同じ原料に対して計3回を行い、減圧により抽出液から溶媒を取り除き、乾固した

エタノール抽出物 77.82 g を得た。

[0053] 上記エタノール抽出物から 4 g を分析用サンプルとして取り除いた後、残りのエタノール抽出物 73.82 g 全量について、ヘキサン及び 90% メタノールで液一液分配を行った。まず、エタノール抽出物に 90% メタノール 500 mL を加え、その後、ヘキサン 500 mL を加えて 1 分間振とうした。溶媒が分離するまで 10 分程度待ち、90% メタノール相を採取した。さらに 2 回同様の操作を繰り返し、得られた 90% メタノール相を併せた後、減圧により溶媒を取り除き、乾固した分配物 54.32 g を得た。

[0054] 上記分配物から 4 g を分析用サンプルとして取り除いた後、残りの分配物 50.32 g 全量について、二塩化メチレン及び水で液一液分配を行った。まず、分配物に水（精製水）500 mL を加え、その後、二塩化メチレン 500 mL を加えて 1 分間振とうした。溶媒が分離するまで 10 分程度待ち、二塩化メチレン相を採取した。さらに 2 回同様の操作を繰り返し、得られた塩化メチレン相を併せた後、減圧により溶媒を取り除き、所定の分配物 27.55 g を得た。なお、以下の記載においては、ここで得られた所定の分配物を「所定の分配物 A」と記載する。

[0055] 次に、上記所定の分配物 A のうち 20.00 g をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付した。

まず、所定の分配物 A 20.00 g とシリカゲル（0.063～0.2 mm の汎用品）60 g とを混合した。その後、シリカゲル（0.040～0.063 mm の汎用品）500 g を詰めたカラム（直径 6 cm、長さ 34 cm、体積約 204 mL のオープンカラム）を用意し、溶出溶媒（n-ヘキサン：酢酸エチル：無水メタノール = 3 : 4 : 2）で平衡化させた後、所定の分配物 A とシリカゲルとの混合物を乗せ、溶出溶媒による溶出を行った。なお、溶出溶媒 1500 mL を用いた後、アセトン 500 mL 及び無水エタノール 500 mL をこの順序でカラムに通し、シリカゲル吸着物を溶出した。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいては、約 20 mL ずつに分けて試験管で採取し、TLC により溶出のパターンを観察した。おおよその溶

出のパターンにより、1～6本目の試験管で得られたものを分画物1-1（溶媒量約0～120mL）、7～24本目の試験管で得られたものを分画物1-2（溶媒量約120～480mL）、25～39本目の試験管で得られたものを分画物1-3（溶媒量約480～780mL）、40～70本目の試験管で得られたものを分画物1-4（溶媒量約780～1400mL）、残りの溶出溶媒、アセトン及び無水エタノールにより得られたものを分画物1-5とした。

なお、上記分画物1-1～1-4が所定の分画物である。

[0056] リナカンチンCの単離は、図2示すフローに沿って行った。所定の分画物Aを得た方法とはシリカゲルカラムクロマトグラフィーの方法が異なるため、上記の方法とは異なる部分についてのみ説明する。

まず、所定の分配物A2.50gとシリカゲル（0.063～0.2mmの汎用品）10gとを混合した。その後、シリカゲル（0.040～0.063mmの汎用品）200gを詰めたカラム（直径2cm、長さ30cm、体積約60mLのオープンカラム）を用意し、溶出溶媒（n-ヘキサン：酢酸エチル=4：1）で平衡化させた後、所定の分配物Aとシリカゲルとの混合物を乗せ、溶出溶媒による溶出を行った。なお、溶出溶媒の量は500mLとした。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいては、約10mLずつに分け試験管で採取し、TLCにより溶出のパターンを観察した。おおよその溶出のパターンにより、1本目の試験管で得られたものを分画物2-1（溶媒量約0～10mL）、2～3本目の試験管で得られたものを分画物2-2（溶媒量約10～30mL）、4～10本目の試験管で得られたものを分画物2-3（溶媒量約30～100mL）とした。

[0057] その後、分画物2-1～2-3について¹H NMR及び¹³C NMRのデータを文献値（ジャーナル オブナチュラル プロダクツ、59巻、808～811ページ、1996年）と比較することで構造の解析を行い、分画物2-2がリナカンチンCであることを確認した。得られたリナカンチンCの量は

、444.2mgであった。

[0058] なお、核磁気共鳴スペクトル装置としては、JEOL JNM-GSX500型核磁気共鳴スペクトル装置（日本電子株式会社製）を用いた。

[0059] 2. 所定の分配物、所定の分画物及びリナカンチンCの神経細胞死抑制作用に関する試験例

当該試験例では、アミロイド β による細胞毒性及び所定の分配物、所定の分画物及びリナカンチンCの神経細胞死抑制作用についての試験を行った。アミロイド β の神経細胞毒性評価には、アミロイド β の神経毒性の作用中心として知られるアミロイド β （25–35）を用いた。

[0060] 本試験例では、神経細胞に対する作用（毒性や薬効）を評価する試験に汎く用いられているPC12細胞（ラット副腎褐色細胞腫由来細胞株）を用いた。PC12細胞は、BCRC（Bioresource Collection and Research Center、生物資源保存及研究中心、台湾）から入手したものを用いた。

入手したPC12細胞は、5%牛胎児血清、10%馬血清、100units/mlペニシリン及び100mg/mlストレプトマイシンを添加したRPMI-1640培地（いずれも、インビトロジェンーギブコ社から入手）を用い、5%炭酸ガス存在下、37°C、飽和湿度下で培養した。

[0061] アミロイド β （25–35）の細胞毒性の評価には、ポリーリー-リジンをコートした96穴マイクロプレートを用いた。当該マイクロプレートに1穴あたり $2 \times 10^4 / 100 \mu L$ のPC12細胞を播種し、5%炭酸ガス存在下、37°C、飽和湿度下で培養した。

培養24時間後に、コントロール区には0.1%DMSO（J.T.Baker社製）、評価区には各サンプル（下記参照。）、ポジティブコントロール区には $10 \mu M$ ガランタミンハイドロプロマイド（抗アルツハイマー病剤であり、神経保護作用を有することが知られている。シグマーアルドリッヂ社を通じて入手。）を添加した。

[0062] 全ての試験区について、アミロイド β （25–35）（シグマーアルドリ

ツチ社を通じて入手) 15 μMを添加したものと、添加しないものとの両方について試験を行った(後述)。培養開始72時間後に、MTT(モレキュラー プローブス社製)による所定の方法により、吸光度570 nmでの吸光度を測定することで試験区ごとの細胞生存率を算出した。

[0063] 本試験例においては、まず、アミロイドβを添加しない状態でコントロール、ポジティブコントロール及び各サンプルについて細胞生存率を算出した。次に、アミロイドβを添加すること以外は同じ条件で各サンプルについて細胞生存率を算出した。そして、アミロイドβを添加したときの細胞生存率の数値を、アミロイドβを添加していないときの細胞生存率の数値で割る計算を行い、当該計算で算出した数値を100倍して%単位とし、そこからからコントロールにおける細胞生存率を差し引いたものを細胞生存回復率とした。

この細胞生存回復率は、サンプルによる細胞生存率への影響を補正した状態において、コントロールよりも何%細胞生存率が回復したのかを示す指標である。

[0064] サンプルとしては、所定の分配物A(二塩化メチレン分配物)、所定の分画物である分画物1-1、所定の分画物である分画物1-2、所定の分画物である分画物1-3、所定の分画物である分画物1-4、及び、リナカンチンC(分画物2-2)を用いた。なお、各サンプルの濃度については、事前に細胞毒性に関するスクリーニング等を行い、適切な濃度を決定した。

なお、ポジティブコントロールに関する実験と本発明の各サンプルに関する実験とは分けて行ったので、図3に示すように、それぞれでコントロールにおける細胞生存率の数値が異なっている。

[0065] 試験例の結果を、図3に示す。図3(a)はポジティブコントロールに関する試験結果を示す表であり、図3(b)は本発明の各サンプルに関する試験結果を示す表である。

図3に示すように、まず、アミロイドβはPC12細胞に対して高い毒性を有することが明らかになった(図3のコントロールの項目参照。)。また

、所定の分配物A、所定の分画物（分画物1－1～1－4）及びリナカンチンCは、高い細胞生存回復率を示すことが明らかになった。

分画物1－1及び分画物1－2による細胞生存回復率はガランタミンハイドロプロマイドに匹敵するものであった。

また、濃度は1 μMと低い値でありながら、リナカンチンCによる細胞生存回復率は30.2%である。10 μM ガランタミンハイドロプロマイドによる細胞生存回復率が17.2%であるため、リナカンチンCは特に高い細胞生存回復率を示すという事実を見出すことができた。

[0066] 上記試験例により、本発明の神経細胞死抑制剤は、アミロイドβの毒性による神経細胞死を抑制する良好な効果、つまり、優れた神経細胞死抑制効果を有することが確認できた。このため、これらを有効成分とする本発明の神経細胞死抑制剤は、抗アルツハイマー病剤及び抗脳機能低下剤としての作用を有すると考えられる。

[0067] [実施例]

以下の実施例により、本発明の神経細胞死抑制剤の有効成分であり、本発明の抗アルツハイマー病剤又は抗脳機能低下剤の有効成分でもあるリナカンチンCを含有する医薬品及び食品の調製法について記載する。なお、リナカンチンCの項目を所定の分配物や所定の分画物に変更することも当然可能である。

[0068] (1) 錠剤

リナカンチンCを用いて、次の処方で錠剤を作製する。

リナカンチンC	0.2 g
乳糖	95.8 g
乾燥コーンスター	2.0 g
タルク	1.8 g
ステアリン酸カルシウム	0.2 g

(調製法)

乳糖(95.8 g)に、リナカンチンC(0.2 g)、乾燥コーンスター

チ（2 g）、タルク（1. 8 g）、ステアリン酸カルシウム（0. 2 g）を添加して混合する。次いで、単発式打錠機を用いて常法により錠剤を作製する。

[0069] (2) ハードカプセル剤

リナカンチンCを用いて、次の処方でハードカプセル剤（1カプセルあたり360 mg）を作製する。

リナカンチンC	5 m g
乳糖	220 m g
コーンスター ^チ	110 m g
ヒドロキシプロピルセルロース	25 m g

(調製法)

リナカンチンC（5 g）に、乳糖（220 g）及びコーンスター^チ（110 g）を添加して混合し、これにヒドロキシプロピルセルロース（25 g）の水溶液を添加して練合する。次いで、押し出し造粒機を用いて、常法により顆粒を製造する。この顆粒をゼラチンハードカプセルに充填することにより、ハードカプセル剤を作製する。

[0070] (3) ソフトカプセル剤

リナカンチンCを用いて、次の処方でソフトカプセル剤（1カプセルあたり170 mg）を作製する。

リナカンチンC	0. 5 m g
大豆油	169. 5 m g

(調製法)

大豆油（169. 5 g）に、リナカンチンC（0. 5 g）を添加して混合する。次いで、ロータリー・ダイズ式自動成型機を用いて、常法に従い、ソフトカプセルに充填することにより、ソフトカプセル剤を作製する。

[0071] (4) 丸剤

リナカンチンCを用いて、次の処方で丸剤（1粒あたり100 mg）を作製する。

リナカンチンC	0. 5 m g
モロヘイヤ末	20. 0 m g
デンプン	30. 0 m g
糖蜜	20. 0 m g
茶抽出物	15. 0 m g
大豆ファイバー	14. 0 m g
セラック	0. 5 m g

(調製法)

上記配合で原料を混合し、適量加水後、練合機で均質な練合物を製造し、得られた練合物を圧延し製丸機を用いて製丸後乾燥して丸剤を作製する。

[0072] (5) 散剤

リナカンチンCを用いて、次の処方で常法により散剤（1包あたり1000m g）を作製する。

リナカンチンC	1 m g
乳糖	799 m g
コーンスターク	200 m g

[0073] (6) ゼリー

リナカンチンCを用いて、次の処方で、常法によりゼリー（100g）を作製する。

リナカンチンC	0. 002 g
ゼラチン	2. 0 g
オレンジ果汁	20. 0 g
水	77. 998 g

(調製法)

上記成分を混合し、90°Cへ加熱する。ゼラチンの溶解を確認してから容器に充填し、冷却する。ゼラチンを固化することでゼリーを作製する。

[0074] (7) 軟膏

リナカンチンCを用いて、次の処方で、常法により軟膏（100g）を作

製する。

(油相成分)

リナカンチンC	0. 1 g
白色ワセリン	20. 0 g
ミネラルオイル	20. 0 g
ステアリルアルコール	5. 0 g
ステアレスー2	3. 0 g
プロピルパラベン	0. 1 g
天然ビタミンE	0. 1 g

(水相成分)

1, 3-ブチレングリコール	5. 0 g
フェノキシエタノール	0. 4 g
ポリソルベート 60	4. 5 g
精製水	適量

全量 100 g

(調製法)

油相成分及び水相成分をそれぞれ80°Cに熱して均一にし、水相を油相に攪拌しながら加え、乳化後冷却し軟膏を作製する。

[0075] (8) テープ剤

リナカンチンCを用いて、次の処方で、常法によりテープ剤(100 g)を作製する。

(粘着剤溶剤)

スチレン-イソプロピレン-スチレンブロック共重合体	7. 0 g
ピコライト	25. 0 g
イソプロピレンゴム	5. 0 g
トルエン	15. 0 g
酢酸エチル	14. 2 g
ヘキサン	25. 0 g

(薬効成分)

リナカンチンC 0.1 g

エタノール 5.0 g

(経皮吸収促進剤)

オレイルアルコール 0.8 g

全量 100 g

(調製法)

粘着剤溶剤及び薬効成分をそれぞれ均一にし、薬効成分及び経皮吸収促進剤を粘着剤溶剤に加え、室温で攪拌し組成物を作製する。この組成物をシリコーン処理したポリエステルフィルム上に延展し、120°Cで乾燥させ冷却後、ポリエチレンフィルムへ粘着剤層を転写させ、テープ剤を作製する。

請求の範囲

- [請求項1] 白鶴靈芝のエタノール抽出物をヘキサン及びメタノールで液一液分配し、前記メタノールに分配される分配物を二塩化メチレン及び水で液一液分配するとき、
前記二塩化メチレンに分配される分配物である所定の分配物のみを有効成分として含有する神経細胞死抑制剤。
- [請求項2] 白鶴靈芝のエタノール抽出物をヘキサン及びメタノールで液一液分配し、前記メタノールに分配される分配物を二塩化メチレン及び水で液一液分配し、前記二塩化メチレンに分配される分配物をn-ヘキサン、酢酸エチル及び無水メタノールから構成される溶出溶媒を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付すとき、
シリカゲルカラムから前記溶出溶媒により溶出される分画物である所定の分画物のみを有効成分として含有する神経細胞死抑制剤。
- [請求項3] 請求項2に記載の神経細胞死抑制剤において、
前記溶出溶媒は、n-ヘキサン：酢酸エチル：無水メタノール=3：4：2の比率からなる溶出溶媒である神経細胞死抑制剤。
- [請求項4] 請求項3に記載の神経細胞死抑制剤において、
前記所定の分画物は、前記シリカゲルカラムクロマトグラフィーに用いるシリカゲルの体積に対して0.1倍～4倍の体積の前記溶出溶媒を用いたときに溶出する分画物である神経細胞死抑制剤。
- [請求項5] 請求項4に記載の神経細胞死抑制剤において、
前記所定の分画物は、前記シリカゲルカラムクロマトグラフィーに用いる前記シリカゲルの体積に対して0.2倍～2.5倍の体積の前記溶出溶媒を用いたときに溶出する分画物である神経細胞死抑制剤。
- [請求項6] リナカンチンCのみを有効成分として含有する神経細胞死抑制剤。
- [請求項7] 請求項1～6のいずれかに記載の神経細胞死抑制剤を有効成分として含有する抗アルツハイマー病剤。
- [請求項8] 請求項1～6のいずれかに記載の神経細胞死抑制剤を有効成分とし

て含有する抗脳機能低下剤。

[請求項9] 請求項7に記載の抗アルツハイマー病剤又は請求項8に記載の抗脳機能低下剤を含有し、抗アルツハイマー病作用又は抗脳機能低下作用を有する医薬品又は食品。

[請求項10] 白鶴靈芝をエタノールで抽出してエタノール抽出物を得る第1工程と、

前記エタノール抽出物をヘキサン及びメタノールで液一液分配し、前記メタノールに分配される分配物を得る第2工程と、

前記メタノールに分配される分配物を二塩化メチレン及び水で液一液分配し、前記二塩化メチレンに分配される分配物である所定の分配物を得る第3工程とをこの順序で含む、前記所定の分配物のみを有効成分として含有する神経細胞死抑制剤の製造方法。

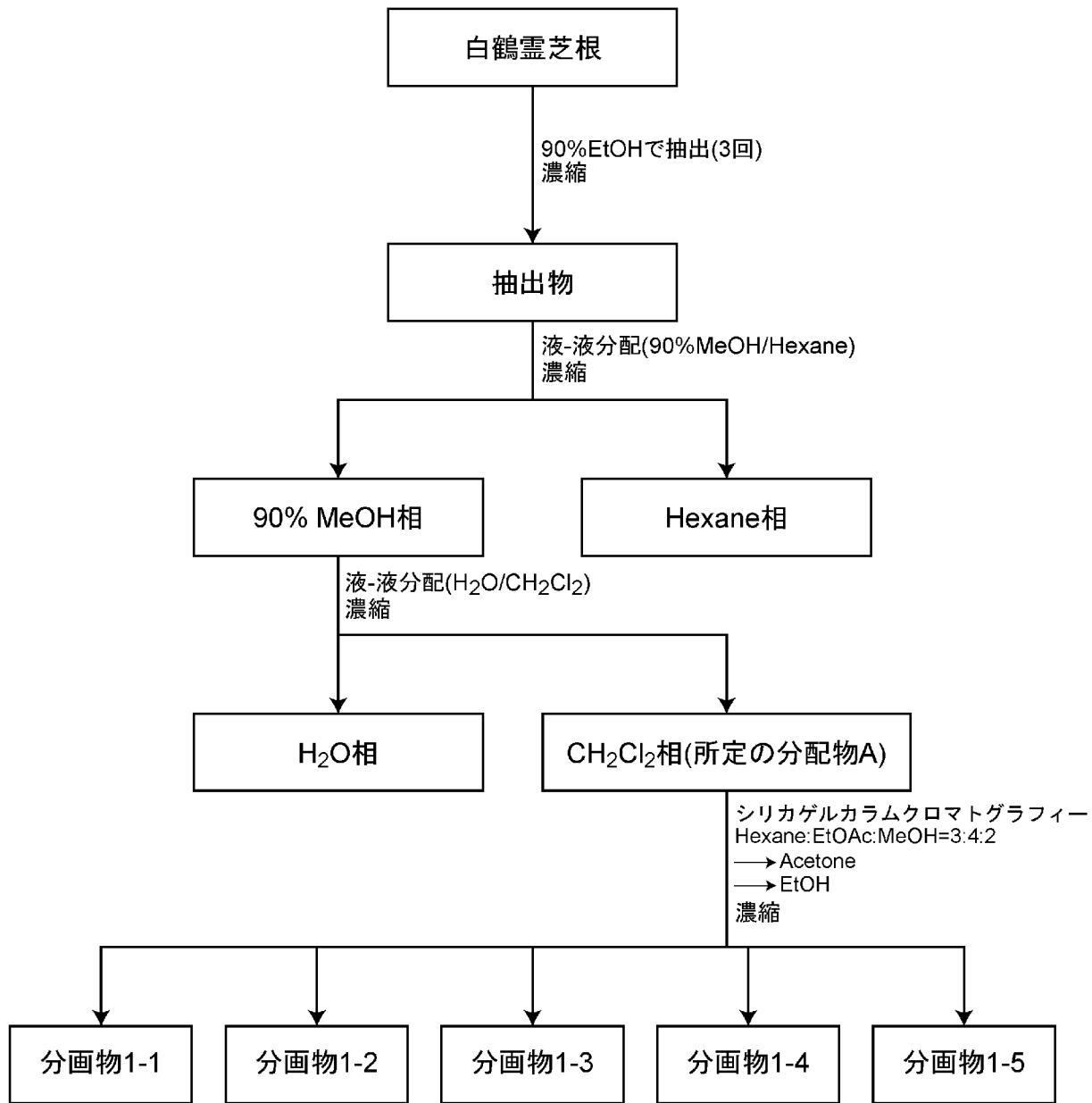
[請求項11] 白鶴靈芝をエタノールで抽出してエタノール抽出物を得る第1工程と、

前記エタノール抽出物をヘキサン及びメタノールで液一液分配して、前記メタノールに分配される分配物を得る第2工程と、

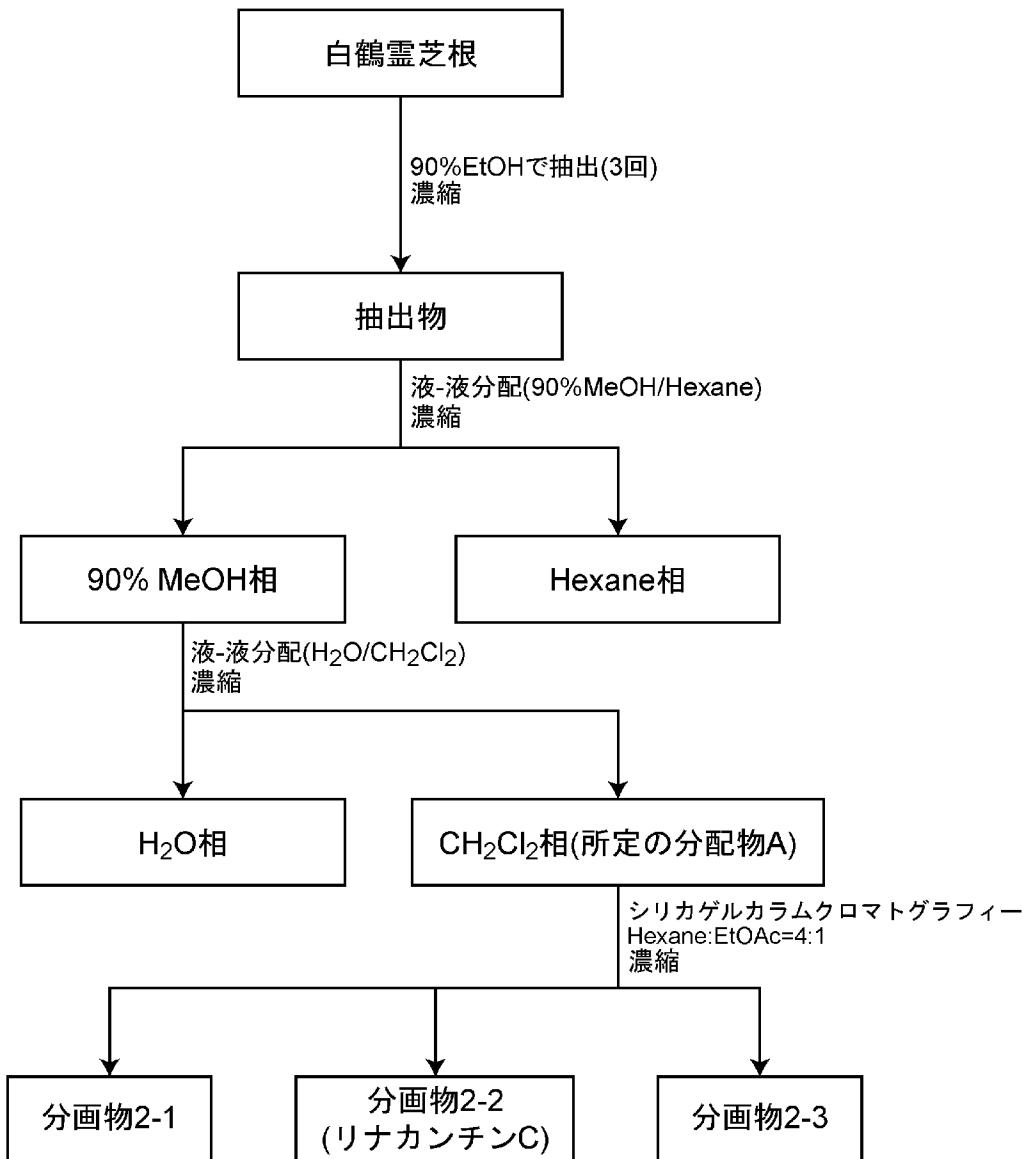
前記メタノールに分配される分配物を二塩化メチレン及び水で液一液分配して、前記二塩化メチレンに分配される分配物を得る第3工程と、

前記二塩化メチレンに分配される分配物をn-ヘキサン、酢酸エチル及び無水メタノールから構成される溶出溶媒を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付して、シリカゲルカラムから前記溶出溶媒により溶出される分画物である所定の分画物を得る第4工程とをこの順序で含む、前記所定の分画物のみを有効成分として含有する神経細胞死抑制剤の製造方法。

[図1]



[図2]



[図3]

(a)

サンプル名	濃度	細胞生存率(Aβなし)	細胞生存率(Aβあり)	細胞生存回復率
コントロール		100	21.1	
ガランタミン ハイドロプロマイド	10μM	95.3%	36.5%	17.2%
ガランタミン ハイドロプロマイド	20μM	79.5%	33.3%	20.8%

(b)

サンプル名	濃度	細胞生存率(Aβなし)	細胞生存率(Aβあり)	細胞生存回復率
コントロール		100	33.6	
所定の分配物A	2.5μg/ml	82.7%	34.5%	8.1%
分画物1-1	25μg/ml	82.9%	44.2%	19.7%
分画物1-2	5μg/ml	72.4%	38.5%	19.6%
分画物1-3	5μg/ml	85.7%	35.6%	7.9%
分画物1-4	100μg/ml	84.3%	34.1%	6.9%
リナカンチンC	1μM	78.8%	50.3%	30.2%

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/069363

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K36/19(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61K31/222(2006.01)i, A61P25/00 (2006.01)i, A61P25/28(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)

A61K36/19, A23L1/30, A61K31/222, A61P25/00, A61P25/28

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	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

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/WPIDS (STN), Japio-GPG/FX*

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 2011-190250 A (Arsoa Honsha Corp.), 29 September 2011 (29.09.2011), claims; paragraphs [0003], [0020] to [0027], [0084] to [0092]; fig. 1 & CN 102167687 A & TW 201129357 A	9/1-8, 10, 11
A	BRIMSON, J.M., et al., <i>Rhinacanthus nasutus Extracts Prevent Glutamate and Amyloid-β Neurotoxicity in HT-22 Mouse Hippocampal Cells: Possible Active Compounds Include Lupeol, Stigmasterol and β-Sitosterol</i> , <i>Int. J. Mol. Sci.</i> , 2012, Vol.13, pp.5074-5097 Abstract, page 5076, lines 6 to 22, Table.1	1-11

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

"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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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

"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)

"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

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"&" document member of the same patent family

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

Date of the actual completion of the international search
03 September 2015 (03.09.15)

Date of mailing of the international search report
15 September 2015 (15.09.15)

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/JP2015/069363

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BRIMSON, J.M., et al., Rhinacanthus nasutus Protects Cultured Neuronal Cells against Hypoxia Induced Cell Death, Molecules, 2011, Vol.16, No.8, pp.6322-6338 Abstract, page 6334, lines 13 to 22	1-11
A	SIRIPONG, P., et al., Induction of apoptosis in tumor cells by three naphthoquinone esters isolated from Thai medicinal plant: Rhinacanthus nasutus KURZ, Biol. Pharm. Bull., 2006, Vol.29, No.10, pp.2070-2076 page 2071, left column, 3rd paragraph	1-11
A	JP 2011-190251 A (Arsoa Honsha Corp.), 29 September 2011 (29.09.2011), entire text & CN 102160862 A & TW 201350115 A	1-11
A	CN 102391277 A (NANJING ZELANG MEDICAL TECH CO.), 28 March 2012 (28.03.2012), entire text (Family: none)	1-11

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K36/19(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61K31/222(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i,
A61P25/28(2006.01)i

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. A61K36/19, A23L1/30, A61K31/222, A61P25/00, A61P25/28

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	1971-2015年
日本国実用新案登録公報	1996-2015年
日本国登録実用新案公報	1994-2015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/WPI-IDS (STN), Japio-GPG/FX

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/ A	JP 2011-190250 A (株式会社アルソア本社) 2011.09.29 & CN 102167687 A & TW 201129357 A 特許請求の範囲、段落 [0003]、段落 [0020] 一段落 [0027]、段落 [0084] 一段落 [0092]、図1	9/ 1-8, 10, 11

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」国際出願目前で、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

03.09.2015

国際調査報告の発送日

15.09.2015

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）

佐々木 大輔

4C 3962

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

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	BRIMSON, J.M., et al., Rhinacanthus nasutus Extracts Prevent Glutamate and Amyloid- β Neurotoxicity in HT-22 Mouse Hippocampal Cells: Possible Active Compounds Include Lupeol, Stigmasterol and β -Sitosterol, Int. J. Mol. Sci., 2012, Vol. 13, pp. 5074-5097 Abstract、第 5076 頁第 6-22 行目、Table. 1	1-11
A	BRIMSON, J.M., et al., Rhinacanthus nasutus Protects Cultured Neuronal Cells against Hypoxia Induced Cell Death, Molecules, 2011, Vol. 16, No. 8, pp. 6322-6338 Abstract、第 6334 頁第 13-22 行目	1-11
A	SIRIPONG, P., et al., Induction of apoptosis in tumor cells by three naphthoquinone esters isolated from Thai medicinal plant: Rhinacanthus nasutus KURZ, Biol. Pharm. Bull., 2006, Vol. 29, No. 10, pp. 2070-2076 第 2071 頁左欄第 3 段落	1-11
A	JP 2011-190251 A (株式会社アルソア本社) 2011.09.29 & CN 102160862 A & TW 201350115 A 文献全体	1-11
A	CN 102391277 A (NANJING ZELANG MEDICAL TECH CO) 2012.03.28 (ファミリーなし) 文献全体	1-11