



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106794199 B

(45) 授权公告日 2021.03.23

(21) 申请号 201580045874.1

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2015.11.02

A61K 35/62 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A23L 33/10 (2006.01)

申请公布号 CN 106794199 A

A61P 25/28 (2006.01)

(43) 申请公布日 2017.05.31

A61P 43/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

2014-223977 2014.11.04 JP

(56) 对比文件

CN 106413722 A, 2017.02.15

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

CN 1873005 A, 2006.12.06

2017.02.24

CN 102724986 A, 2012.10.10

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 102038713 A, 2011.05.04

PCT/JP2015/080934 2015.11.02

CN 101543512 A, 2009.09.30

(87) PCT国际申请的公布数据

CN 101095697 A, 2008.01.02

W02016/072392 JA 2016.05.12

CN 103702661 A, 2014.04.02

(73) 专利权人 井石有限会社

WO 2006082609 A1, 2006.08.10

地址 日本宫崎县

Edwin L. Cooper等.“Unearthing a

(72) 发明人 石井阳一 根本隆行 冈本猛

source of medicinal molecules”.《Drug

Discovery Today》.2010, 第15卷 (第21/22期),

审查员 何梅孜

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

权利要求书1页 说明书9页 附图4页

务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(54) 发明名称

Tau蛋白产生促进剂、起因于缺乏Tau蛋白的
疾病的治疗药/预防药

(57) 摘要

提供含有天然物作为有效成分的Tau蛋白产
生促进剂、起因于缺乏Tau蛋白的疾病的治疗药/
预防药。蚯蚓的干燥粉末、磨碎物和/或萃取物作
为有效成分的Tau蛋白产生促进剂、起因于缺乏
Tau蛋白的疾病的治疗药/预防药。前述起因于缺
乏Tau蛋白的疾病优选为阿尔兹海默病。

1. 蚯蚓的干燥粉末、磨碎物和/或萃取物在Tau蛋白产生促进剂的制造中的应用，所述蚯蚓的干燥粉末、磨碎物和/或萃取物是利用具备如下工序的制造方法而得到的：使活蚯蚓与选自由钾、钠、镁及钙组成的组中的至少1种金属的氯化物接触，之后，使粉末状羟基羧酸与活蚯蚓接触，用水稀释调节成pH2~5、或将活蚯蚓浸渍在调节成pH2~5的羟基羧酸水溶液中，

保持3~180分钟后，水洗活蚯蚓并磨碎，

所述蚯蚓为红蚯蚓(*Lumbricus rubellus*)，

所述Tau蛋白产生促进剂用于预防或治疗起因于缺乏Tau蛋白的疾病，

所述疾病选自慢性创伤性脑病、关岛-帕金森痴呆综合症、伴随无淀粉样蛋白斑的阿尔兹海默病类似的神经原纤维缠结的神经原纤维缠结优势型老年痴呆症、神经节神经胶质瘤、神经节细胞瘤、亚急性硬化性全脑炎、结节性硬化症、Hallervorden-Spatz病、额颞叶痴呆组成的组。

2. 权利要求1中所述的Tau蛋白产生促进剂在起因于缺乏Tau蛋白的疾病的治疗药或预防药的制造中的应用，

所述起因于缺乏Tau蛋白的疾病选自慢性创伤性脑病、关岛-帕金森痴呆综合症、伴随无淀粉样蛋白斑的阿尔兹海默病类似的神经原纤维缠结的神经原纤维缠结优势型老年痴呆症、神经节神经胶质瘤、神经节细胞瘤、亚急性硬化性全脑炎、结节性硬化症、Hallervorden-Spatz病、额颞叶痴呆组成的组。

3. 蚯蚓的干燥粉末、磨碎物或萃取物在起因于缺乏Tau蛋白的疾病的治疗药或预防药的制造中的应用，

所述蚯蚓的干燥粉末、磨碎物和/或萃取物是利用具备如下工序的制造方法而得到的：使活蚯蚓与选自由钾、钠、镁及钙组成的组中的至少1种金属的氯化物接触，

之后，使粉末状羟基羧酸与活蚯蚓接触，用水稀释调节成pH2~5、或将活蚯蚓浸渍在调节成pH2~5的羟基羧酸水溶液中，

保持3~180分钟后，水洗活蚯蚓并磨碎，

所述蚯蚓为红蚯蚓(*Lumbricus rubellus*)，

所述起因于缺乏Tau蛋白的疾病选自慢性创伤性脑病、关岛-帕金森痴呆综合症、伴随无淀粉样蛋白斑的阿尔兹海默病类似的神经原纤维缠结的神经原纤维缠结优势型老年痴呆症、神经节神经胶质瘤、神经节细胞瘤、亚急性硬化性全脑炎、结节性硬化症、Hallervorden-Spatz病、额颞叶痴呆组成的组。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的应用，其中，所述额颞叶痴呆选自由匹克氏病、进行性核上性麻痹、与17号染色体相关且伴随帕金森病的额颞叶痴呆症组成的组。

Tau蛋白产生促进剂、起因于缺乏Tau蛋白的疾病的治疗药/预防药

技术领域

[0001] 本发明涉及Tau蛋白产生促进剂、起因于缺乏Tau蛋白的疾病的治疗药/预防药。

背景技术

[0002] Tau蛋白是微管结合蛋白 (microtubule-associated protein) 的一种。在中枢神经系统的神经细胞中含有特别多的Tau蛋白, Tau蛋白与主要构成细胞骨架之一的微管的被称为微管蛋白的蛋白质结合, 具有促进微管的稳定化、微管蛋白向微管结合的功能。另外, 已知Tau蛋白也与除了微管蛋白以外的其他信号分子群 (Srcfamily、PI3K、Fyn) 结合, 促进神经突伸长、神经生长锥伸长 (例如非专利文献1~3)。

[0003] 在生物体内, 可能发生Tau蛋白的过度的磷酸化。若Tau蛋白过度地磷酸化, 则与微管蛋白的结合受到阻碍, 引起微管的减少, 另外, 微管不稳定化而细胞内的物质输送被抑制 (例如, 非专利文献4、5)。过度磷酸化的Tau蛋白聚集, 形成称为神经原纤维缠结的聚集体。在脑内产生神经原纤维缠结的阿尔兹海默病、进行性核上性麻痹分类为被称为Tau蛋白病 (tauopathy) 的神经退行性疾病。

[0004] 提出了通过补偿Tau蛋白的功能来治疗Tau蛋白病的方法。例如, 美国专利第5,580,898号中启示了为了通过使微管稳定化来治疗阿尔兹海默病的患者, 使用紫杉醇 [TAXOL (注册商标)]。另外, 专利文献1中记载有使用了作为微管稳定剂的埃博霉素D的Tau蛋白病治疗的有效疗法。

[0005] 另一方面, 蚯蚓萃取物、蚯蚓干燥粉末自古以来主要在东方各国主要作为各种疾病的预防剂、治疗剂使用, 至今为止, 已知作为膀胱内结石缩小剂及排出促进剂、黄疸治疗剂、分娩促进剂、强壮剂、育毛剂、强精剂、解热剂、痉挛治疗剂、血液循环促进剂、半身不遂治疗剂、间接镇痛剂、排尿剂、支气管哮喘剂、高血压症治疗剂的用途。

[0006] 但是, 至今未有在阿尔兹海默病等Tau蛋白病的预防/治疗中利用蚯蚓的报告例。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:日本特表2011-522782号公报

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献1:Lee, G, Biochimica et Biophysica Acta (2005) 1739:323-330

[0012] 非专利文献2:Reynolds, CH et al., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (2008) 283:18177-18186

[0013] 非专利文献3:Nemoto, T et al., Neurochemistry International (2011) 59:880-888

[0014] 非专利文献4:Bramblett GT, et al., Neuron (1993) 10:1089-1099

[0015] 非专利文献5:Yoshida H, et al., J Neurochem (1993) 61:1183-86

发明内容

[0016] 发明要解决的问题

[0017] 考虑在阿尔兹海默病等Tau蛋白病的治疗中伴随长期的药剂的给予,因此特别需要安全且副作用少的药剂,要求补偿由于磷酸化而无法正常工作的Tau蛋白的功能的、来自天然物的预防/治疗药。

[0018] 因此,本发明的目的为提供含有天然物作为有效成分的Tau蛋白产生促进剂、起因于缺乏Tau蛋白的疾病的预防/治疗剂、起因于缺乏Tau蛋白的疾病的症状的改善用医药用组合物。

[0019] 用于解决问题的方案

[0020] 即,本发明的Tau蛋白产生促进剂的特征在于,含有蚯蚓的干燥粉末、磨碎物和/或萃取物作为有效成分。

[0021] 本发明的起因于缺乏Tau蛋白的疾病的治疗药或预防药的特征在于,含有前述Tau蛋白产生促进剂。

[0022] 对于本发明的起因于缺乏Tau蛋白的疾病的治疗药或预防药,前述起因于缺乏Tau蛋白的疾病优选为阿尔兹海默病。

[0023] 本发明的Tau蛋白产生促进剂的制造方法的特征在于,使用蚯蚓的干燥粉末、磨碎物或萃取物。

[0024] 本发明的起因于缺乏Tau蛋白的疾病的治疗药或预防药的制造方法的特征在于,使用蚯蚓的干燥粉末、磨碎物或萃取物。

[0025] 本发明的Tau蛋白的产生促进方法的特征在于,使用蚯蚓的干燥粉末、磨碎物和/或萃取物。

[0026] 本发明的蚯蚓的干燥粉末、磨碎物或萃取物用于起因于缺乏Tau蛋白的疾病的治疗。

[0027] 本发明的起因于缺乏Tau蛋白的疾病的治疗方法或预防方法的特征在于,将蚯蚓的干燥粉末、磨碎物和/或萃取物以有效量给予对象。

[0028] 发明的效果

[0029] 根据本发明,可以提供含有天然物作为有效成分的Tau蛋白产生促进剂、起因于缺乏Tau蛋白的疾病的预防/治疗剂、起因于缺乏Tau蛋白的疾病的症状的改善用医药用组合物。

附图说明

[0030] 图1为示出调查溶解有蚯蚓干燥粉末的培养液中的培养(48小时、37°C、蚯蚓干燥粉末溶解浓度100ng/ml)所致的、大鼠海马神经元的Tau蛋白(Tau)、Akt、GSK-3β及β-肌动蛋白的产生量的变化、以及Tau蛋白(Tau)、Akt及GSK-3β的磷酸化量的变化(分别为pTau、pAkt、pGSK-3β)的蛋白质印迹(Western blot)的结果的照片图。“-”及“+”分别表示将蚯蚓干燥粉末溶解于培养液NM5及培养液NM5中所得的培养液(100ng/ml)中培养大鼠海马神经元的结果。需要说明的是,Tau蛋白以Ser396作为磷酸化的指标、Akt以Ser473作为磷酸化的指标、及GSK-3β以Ser9作为磷酸化的指标进行评价。

[0031] 图2为示出由图1所示的蛋白质印迹的结果使用图像解析软件ImageJ64进行了定

量的Tau蛋白(Tau)、Akt及GSK-3 β 的浓度、以及它们磷酸化后的pTau、pAkt及pGSK-3 β 的浓度的图标。A从左示出以 β -肌动蛋白作为基准的pTau的浓度及Tau蛋白的浓度以及pTau相对于Tau蛋白的比率，B从左示出以 β -肌动蛋白作为基准的Akt的浓度及pAkt的浓度以及pAkt相对于Akt的比率、以及C从左示出以 β -肌动蛋白作为基准的GSK-3 β 的浓度及pGSK-3 β 的浓度以及pGSK-3 β 相对于GSK-3 β 的比率。

[0032] 图3为示出调查由溶解有蚯蚓干燥粉末的培养液中的培养(48小时、37℃)所致的、大鼠海马神经元的Tau蛋白(Tau)及 β -肌动蛋白的产生量的、由蚯蚓干燥粉末溶解浓度引起的变化的蛋白质印迹的结果的照片图(A)，以及示出使用图像解析软件ImageJ64进行了定量的以 β -肌动蛋白作为基准的Tau蛋白的浓度变化的图表(B)。

[0033] 图4为示出调查由溶解有蚯蚓干燥粉末的培养液中的培养(37℃、蚯蚓干燥粉末溶解浓度100ng/ml)所致的、大鼠海马神经元的Tau蛋白(Tau)及 β -肌动蛋白的产生量的、由培养时间引起的变化的蛋白质印迹的结果的照片图(A)，以及使用图像解析软件ImageJ64进行了定量的以 β -肌动蛋白作为基准的Tau蛋白的浓度变化的图表(B)。

[0034] 图5为对在培养液NM5及培养液NM5中溶解有蚯蚓干燥粉末的培养液(100ng/ml)中在37℃培养48小时的大鼠海马神经元中的Tau蛋白(Tau)及pTau进行免疫染色所得的荧光照片图。上面(无(None))示出培养液、下面(RW)示出在蚯蚓干燥粉末溶解培养液中培养的荧光照片图。左侧示出Tau蛋白的荧光照片图、中央示出pTau的荧光照片图、以及右侧示出Tau蛋白及pTau的荧光照片图。

具体实施方式

[0035] 本发明方法中，用于原料的蚯蚓没有特别限定，例如可使用红蚯蚓(*Lumbricus rubellus*)、LT蚯蚓(*Lumbricus terrestris*)、赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)、缟蚯蚓(*Allolobophora caliginosa*)、八毛枝蚓(*Dendrobaena octaedra*)、樱蚯蚓(*Allolobophora japonica Michaelsen*)、八田蚯蚓(*Drawida hattamimizu Hatai*)、背黑蚯蚓(*Pheretima divergens Michaelsen*)、普通蚯蚓(*Pheretima communissima*)、田地蚯蚓(*Pheretima agrestis*)、西宝环毛蚓(*Pheretima sieboldi Horst*)、黑氏环毛蚓(*Pheretima hilgendorfi*)、湖滨蚯蚓(*Pontodrilus matsushimensis Iizuka*)、丝蚯蚓(*Tubifex hattai Nomura*)、后藤丝蚯蚓[*Limnodrilus gotoi Hatai=L.Socialis Stephenson*]等。

[0036] 本发明中，蚯蚓的干燥粉末是指，将未处理的或经过前处理的蚯蚓的磨碎物或萃取物干燥而得到的粉末。另外，蚯蚓的磨碎物是指，将未处理的或经过前处理的蚯蚓磨碎而得到的液态或糊状的物质。蚯蚓的萃取物是指，将未处理的或经过前处理的蚯蚓或其磨碎物溶解于水或有机溶剂，去除或分离不溶性馏分而得到的提取物。前述前处理没有特别限定，可列举后述的污物等的去除处理等。另外，蚯蚓的干燥粉末、磨碎物及萃取物也可进行后处理，作为后处理可列举造粒、过滤、精制、浓缩、稀释及pH调节等。

[0037] 用于得到蚯蚓的磨碎物的磨碎方法没有特别限定，例如可以使用均质机、混合器、均相搅拌机、擂溃机、加压型细胞破坏装置等磨碎。

[0038] 用于得到蚯蚓的萃取物的萃取方法没有特别限制，例如将蚯蚓的干燥粉末或磨碎物溶解于萃取溶剂，去除或分离不溶性馏分而可萃取。作为萃取溶剂，可列举水、水溶液以

及乙醇、丙酮及乙酸乙酯等有机溶剂,可单独1种或组合2种以上。其中,优选水、乙醇或乙醇水溶液。

[0039] 用于得到蚯蚓的干燥物的干燥方法没有特别限定,可利用冷冻干燥、加热干燥及喷雾干燥等干燥方法进行干燥。其中,根据后述的理由,优选冷冻干燥。

[0040] 本发明中,蚯蚓的干燥粉末、磨碎物或萃取物根据其目的配混有效量即可。适当的配混量依赖于目的、给予途径及形态、蚯蚓的干燥粉末等制造方法等各种因素,但去除后述的残留在蚯蚓的消化管内的消化物、附着在表皮的污物等后,将蚯蚓磨碎,换算成将磨碎物冷冻干燥而得到的蚯蚓的干燥粉末的重量,将起因于缺乏Tau蛋白的疾病的预防或轻度的疾病的治疗作为目的时,优选为每1天1~15000mg,更优选为每1天12~1800mg,进一步优选为每1天120~180mg。另外,起因于缺乏Tau蛋白的重度的疾病治疗作为目的时,优选为每1天1~15000mg,更优选为每1天18~3600mg,进一步优选为每1天180~360mg。

[0041] 本发明的Tau蛋白产生促进剂、治疗药、预防药的形状没有特别限定,可以为固态、粉末、半固态及液态的任意者均可。

[0042] 本发明中可直接使用蚯蚓的干燥粉末、磨碎物或萃取物。另外,特别是本发明的Tau蛋白产生促进剂、治疗药及预防药中,也可包含药学上接受的载体,例如作为片剂、颗粒剂、散剂、胶囊剂、软胶囊剂、溶液剂、注射剂、栓剂、缓释剂等,可经口或非经口(例如静脉给予、直接给予于患部等)地给予。作为药学上可接受的载体,可使用赋形剂、粘合剂、崩解剂、流化剂、润滑剂、涂布剂、悬浊剂、着色剂、甜味剂或表面活性剂等,依照公知的方法可制成一般的医药制剂的形态。另外,也可包含其他治疗/预防成分、药学上可接受的添加剂。

[0043] 另外,本发明特别是本发明的Tau蛋白产生促进剂中也可包含食品中通常使用的添加剂。可使用例如赋形剂、粘合剂、崩解剂、流化剂、润滑剂、涂布剂、悬浊剂、着色剂、甜味剂或表面活性剂等。另外,也可包含其他食品或来自食品的成分。

[0044] 本发明中,蚯蚓的干燥粉末、磨碎物及萃取物中,从制造工序的保存稳定性的观点出发,优选使用蚯蚓的干燥粉末。也可以使蚯蚓的干燥粉末预先溶解和/或分散于水等液体后,与药学上的通常的载体、添加剂等其他成分混合。

[0045] 本发明中没有特别限定起因于缺乏Tau蛋白的疾病,但优选为Tau蛋白病,更优选选自由阿尔兹海默病、匹克氏病、大脑皮质变性病、进行性核上性麻痹、慢性创伤性脑病、与17号染色体相关且伴随帕金森病的额颞叶痴呆症、关岛-帕金森痴呆综合症、伴随无淀粉样蛋白斑的阿尔兹海默病类似的神经原纤维缠结的神经原纤维缠结优势型老年痴呆症、神经节神经胶质瘤、神经节细胞瘤、亚急性硬化性全脑炎、结节性硬化症、Hallervorden-Spatz病、额颞叶痴呆、额颞叶变性病组成的组。特别优选为阿尔兹海默病。

[0046] 为了将蚯蚓作为原料进行经口给予,优选去除残留在蚯蚓的消化管内的消化物、附着在表皮的污物等。本发明中,没有特别限定去除方法,也可使用公知的方法去除。可使用例如将蚯蚓生物体浸渍在如钠盐或钾盐那样的碱盐水溶液中,使消化管内的黄土排泄的方法(日本特开平1-47718号公报、日本特开平1-47719号公报、日本特开平1-47720号公报及日本特开平1-268639号公报中记载的方法);将蚯蚓生物体放置维持于6~26℃的酸水溶液中0.1~5小时而去除消化管内的粪土的方法(日本特开平3-72427号公报中记载的方法)等。

[0047] 本发明中,作为去除方法,优选使下述的金属的氯化物和/或羟基羧酸与蚯蚓接触

的方法。

[0048] 上述金属的氯化物是选自钾、钠、镁及钙组成的组中的至少1种金属的氯化物。即，是选自氯化钾、氯化钠、氯化镁及氯化钙组成的组中的至少1种。另外，也可以为上述物质的混合物，上述物质与能够添加于食品中的其他无害成分的混合物。作为这样的混合物，可列举例如食盐、岩盐、天日盐。上述金属的氯化物可以通过将粉末状的物质撒在活蚯蚓上来使用，由此引起蚯蚓与金属的氯化物的接触。

[0049] 使上述金属的氯化物接触活蚯蚓后，优选使活蚯蚓如下所示与羟基羧酸接触。另外，也可以不与上述金属的氯化物接触，如下所述进行羟基羧酸与蚯蚓的接触。

[0050] 关于与上述羟基羧酸的接触，也可以通过将粉末状羟基羧酸撒在活蚯蚓上进行。另外，也可浸渍在pH2～5的羟基羧酸水溶液中。经由与金属的氯化物的接触后进行与羟基羧酸的接触时，优选在与上述金属的氯化物的接触后迅速地进行与羟基羧酸的接触。另外，在使活蚯蚓与羟基羧酸接触之前，优选水洗蚯蚓。通过水洗去除上述金属的氯化物后使蚯蚓与羟基羧酸接触时，可得到酶活性高的蚯蚓干燥粉末。与羟基羧酸的接触前进行水洗时，在开始与金属的氯化物接触后，优选30分钟以内、更优选20分钟以内进行水洗。没有特别限定水洗方法，可采用公知的方法。

[0051] 使活蚯蚓长时间与羟基羧酸粉末接触时会死亡，生活功能消失，消化管内的消化物无法排泄，因此优选的是尽可能迅速地优选30秒以内、更优选以20秒以内用水稀释羟基羧酸，将pH调节成2～5的范围。

[0052] 由于羟基羧酸形成对于蚯蚓不舒服的生活环境，所以活蚯蚓是通过自己保存本能放出体液、排泄物而改善生活环境。另外，因为羟基羧酸具有杀菌性，所以发挥如前所述地促进消化器内残留的消化物等的排泄的作用，并且可以期待对蚯蚓上附着的杂菌进行杀菌的效果。

[0053] 上述方法中使用的结晶状羟基羧酸在使用条件下呈现结晶状体即可，可与其羟基数或羧基数无关地使用。即，单羟基单羧酸、单羟基多羧酸、多羟基单羧酸、多羟基多羧酸中的任意者均可。

[0054] 作为本发明中使用的羟基羧酸，可列举例如乙醇酸、乳酸、乙酸、 β -羟基丙酸、 α -羟基正丁酸、 β -羟基正丁酸、 α -羟基正戊酸、 β -羟基正戊酸、苹果酸、 α -甲基苹果酸、 α -羟基戊二酸、 β -羟基戊二酸、柠檬酸、丙二酸及琥珀酸等。其中，从对于食品可使用且容易获取的角度考虑，优选为乳酸、乙酸、苹果酸、柠檬酸、丙二酸及琥珀酸。羟基羧酸可以单独使用1种，也可混合2种以上使用。

[0055] 活蚯蚓组织的65%为水分。作为活蚯蚓的保命功能运作的时间，有某种程度富余，但若活蚯蚓死亡，则酶将工作，所以放置于不舒服生活环境下的时间的控制必须慎重进行。此时间依条件而被左右，但通常为3～180分钟的范围。

[0056] 以羟基羧酸处理的蚯蚓生物体优选如下进行：利用水清洗后，磨碎成液状或糊状的磨碎物。清洗优选用纯水进行。清洗方法并不特别限定，可采用公知的水洗方法。另外，磨碎前的处理工序的合计时间、即自将金属的氯化物撒于活蚯蚓至用水清洗羟基羧酸结束的时间，优选总计为240分钟以内。

[0057] 上述磨碎方法并不特别限定，例如使用均质机、混合器、均相搅拌机、擂溃机、加压型细胞破坏装置，通常于1～25℃进行。从抑制蚯蚓构成成分分解的观点出发，优选于低温

下进行,优选2~15℃的温度。

[0058] 由磨碎蚯蚓所得的磨碎物收纳于例如不锈钢制托盘,施以冷冻干燥。此时,蚯蚓生物体所含的酶虽不作用于活细胞,但因为对死细胞瞬间作用,因此有产生腐败性气体的担心,为防止此,优选瞬间急速冷却/冷冻至-18℃~-35℃,抑制酶的作用后,进行冷冻干燥。

[0059] 为了如此地不损害蚯蚓原本的药理作用而粉末化,优选迅速地冷冻,但另一方面,使以过短时间冷冻时,与作为蚯蚓糊主要成分的蛋白质一同存在的杂质形成点状的不冻结部分,有时不能分离,所以过度急速的冷冻不理想。因此,冷冻优选在-18℃至-35℃的低温下必要进行20~240小时、更优选进行50~170小时。

[0060] 冷冻干燥时,重要的是选择能够去除水分和杂质而不会残留的条件。因此,优选于压力50Pa以下、-60℃至+90℃的温度,边阶段地提高温度,边控制在10~60小时的范围进行。

[0061] 作为冷冻干燥的方法,例如如前述那样将磨碎物以-18℃至-35℃的温度必要冷冻20~240小时后,于-60℃~+90℃的温度分多个阶段进行升温,边于压力25~40Pa分多个阶段减压,边冷冻干燥10~60小时,由此可得到无菌状态的淡黄色蚯蚓干燥粉末。

[0062] 进而,优选具备下述工序:将经冷冻干燥的前述磨碎物溶解于水或乙醇水溶液,去除或分离不溶性馏分。去除或分离不溶性馏分的工序可与上述同样地进行经由放置的沉淀、离心、过滤等。优选边搅拌或振动边进行溶解于水或乙醇水溶液的工序。溶解于水所需的时间优选为1~120分钟,更优选为5~80分钟。乙醇水溶液的乙醇浓度没有特别限制,但优选为10~70% (v/v),更优选为30~60%。

[0063] 对于本发明的Tau蛋白产生促进剂、治疗药、预防药,可以如上所述将溶解于水或乙醇水溶液的上清液直接以水溶液的状态使用,也可以去除水分以浓缩液的形式使用,也可以使其干燥制成粉末状使用。也可以将上清液干燥并制成粉末状后溶解于水中使用。另外,也可以直接使用蚯蚓糊经冷冻干燥后的粉末,而不溶解于水或乙醇水溶液。

[0064] 另外,本发明中作为去除方法,优选如下进行:将活蚯蚓放置于不舒服环境下处理之前,即,使上述活蚯蚓与金属的氯化物或羟基羧酸接触之前,将活蚯蚓移动到如面包箱那样的扁箱中,放置于明亮处10~50小时,去除附着于表皮的污物。于明亮处的放置时间更优选为12~24小时。作为此时的收纳量,优选为蚯蚓堆栈为30~60mm、优选40~50mm的厚度的程度的量。该扁箱内,使砂、泥那样的异物不存在,另外,蚯蚓为夜行性且于黑暗处的生活活动变得活跃,有消耗体力的担心,所以夜晚优选通过电照培养方式等保持明亮。通过该处置,活蚯蚓发挥其自我防御本能,将消化管内残留的消化物排泄,此排泄物会覆盖全身,防止水分蒸发,以维持其生活环境,所以若该覆盖的污物即排泄物用适当的手段反复进行剥离,则最后可去除消化管内的消化物以及附着于表皮的污物。

[0065] 附着于蚯蚓的表皮的污物的剥离,例如可使用无纺布覆盖活蚯蚓,使污物吸附在无纺布上来进行。通过将该明亮处的放置及去除附着于表皮的污物以及与上述金属氯化物和/或羟基羧酸相接触进行组合,可期待蚯蚓体内有毒物的进一步排出、去除。

[0066] 本发明中作为得到蚯蚓的干燥粉末的方法,特别是从干燥粉末的保存稳定性的观点出发,优选下述方法。

[0067] (A-1) 一种蚯蚓的干燥粉末的制造方法,其具备如下工序:

[0068] 使活蚯蚓与选自由钾、钠、镁及钙组成的组中的至少1种金属的氯化物接触,

[0069] 之后,使粉末状羟基羧酸与活蚯蚓接触,用水稀释调节成pH2~5,保持3~180分钟后,水洗活蚯蚓并磨碎,将得到的磨碎物冷冻干燥。

[0070] (A-2)一种蚯蚓的干燥粉末的制造方法,其具备如下工序:

[0071] 使活蚯蚓与选自钾、钠、镁及钙组成的组中的至少1种金属的氯化物接触,

[0072] 之后,将活蚯蚓浸渍在调节成pH2~5的羟基羧酸水溶液中,保持3~180分钟后,水洗活蚯蚓并磨碎,将得到的磨碎物进行冷冻干燥。

[0073] (A-3)一种蚯蚓的干燥粉末的制造方法,在前述(A-1)或(A-2)中,进一步具备如下工序:使经冷冻干燥的前述磨碎物溶解于水或乙醇水溶液,去除或分离不溶性馏分后,进一步进行冷冻干燥。

[0074] 另外,将活蚯蚓磨碎而成的磨碎物进行冷冻干燥后,从干燥物的杀菌的观点出发,优选将得到的干燥物以110°C以上且低于130°C进行加热处理。加热温度低于110°C时,有干燥物的杀菌不充分的情形,130°C以上时,包含在蚯蚓干燥物中的酶失活而活性降低,故不优选。更优选为115~125°C。加热方法没有特别限定,可列举吹热风的方法、使用加热夹套的方法、放置于托盘等而用加热器加热的方法、使用定温恒温器的方法等。加热时间优选为30秒~130分钟、更优选为30分钟~90分钟,进一步优选为60分钟~90分钟。加热时间过短时,有时杀菌不充分,加热时间过长时,会失去酶活性,故不优选。需要说明的是,由于若对液体中的酶进行上述加热处理则会失去酶活性,所以本发明中优选使用蚯蚓的干燥粉末。

[0075] 本发明中作为得到蚯蚓的磨碎物的方法,优选下述方法。

[0076] (B-1)一种蚯蚓的磨碎物的制造方法,其具备如下工序:

[0077] 使活蚯蚓与选自钾、钠、镁及钙组成的组中的至少1种金属的氯化物接触,

[0078] 之后,使粉末状羟基羧酸与活蚯蚓接触,用水稀释调节成pH2~5,保持3~180分钟后,水洗活蚯蚓并磨碎。

[0079] (B-2)一种蚯蚓的磨碎物的制造方法,其具备如下工序:

[0080] 使活蚯蚓与选自钾、钠、镁及钙组成的组中的金属的氯化物接触,

[0081] 之后,将活蚯蚓浸渍在调节成pH2~5的羟基羧酸水溶液中,保持3~180分钟后,水洗活蚯蚓并磨碎。

[0082] 本发明中,作为得到蚯蚓的萃取物的方法,优选下述方法。

[0083] (C-1)一种蚯蚓的萃取物的制造方法,其具备如下工序:

[0084] 使活蚯蚓与选自钾、钠、镁及钙组成的组中的至少1种金属的氯化物接触,

[0085] 之后,使粉末状羟基羧酸与活蚯蚓接触,用水稀释调节成pH2~5,保持3~180分钟后,水洗活蚯蚓并磨碎,将得到的磨碎物经冷冻干燥后溶解于水或乙醇水溶液,去除或分离不溶性馏分。

[0086] (C-2)一种蚯蚓的萃取物的制造方法,其具备如下工序:

[0087] 使活蚯蚓与选自钾、钠、镁及钙组成的组中的金属的氯化物接触,

[0088] 之后,将活蚯蚓浸渍在调节成pH2~5的羟基羧酸水溶液中,保持3~180分钟,然后水洗活蚯蚓并磨碎,将得到的磨碎物冷冻干燥后溶解于水或乙醇水溶液,去除或分离不溶性馏分。

[0089] 实施例

[0090] 以下通过实施例进一步详细说明本发明。本发明不受以下实施例的任何限制。需

要说明的是,以下,在没有特别说明的情况下,“%”全部为质量基准。

[0091] [蚯蚓干燥粉末的制备]

[0092] 将放置在明亮处24小时后剥离表皮上附着的污物的活红蚯蚓30kg,在平盘上展开并使厚度约为5cm,在其上均匀地撒上250g氯化钠。20分钟后,将蚯蚓进行水洗。然后,同样地撒上250g柠檬酸之后以15秒加入30升纯水进行稀释。此时,在刚加入水之后的pH为2.25,完全稀释时的pH为2.74。撒上柠檬酸粉末时,蚯蚓一口气释放出黄色的体液。以水稀释后,在该状态下保持20分钟。接着,从污浊的柠檬酸水溶液中取出活蚯蚓,经水洗后,用均质机在10℃的条件下进行磨碎,从而制备蚯蚓糊。接着,对该蚯蚓糊进行抽吸脱气,去除其中含有的气体后,将其转移到不锈钢制托盘上,并瞬间骤冷至-35℃,并在该温度下维持50小时进行缓慢冷冻。将经冷冻的蚯蚓糊以-35℃将压力0Pa保持2小时之后,升温至温度25℃,在40Pa下干燥10小时,接着在40℃、压力35Pa下干燥14小时,接着在65℃、压力35Pa下干燥12小时,最后将温度设为80℃、压力25Pa下保持6小时,由此进行真空冷冻干燥。通过该处理得到了含水量8质量%的淡黄色蚯蚓干燥粉末。

[0093] 使用RM-50D型加热装置(株式会社大河原制作所制),对在上述中得到的蚯蚓干燥粉末进行加热处理。加热条件是用时90分钟加热至120℃之后,在120℃加热20分钟,用时240分钟冷却至40℃之后,取出蚯蚓干燥粉末。

[0094] 以乙醇:冷冻干燥粉末成为20:1(v/w)的方式将经加热处理的蚯蚓干燥粉末溶解于50%乙醇水溶液,在室温(25℃)下以1500rpm振动1小时。之后,以4℃、10000×g离心15分钟,分离上清液,在75℃减压浓缩15分钟。将得到的上清液移至不锈钢制托盘上,并瞬间骤冷至-35℃,在此温度保持50小时进行缓慢冷冻。将经冷冻的蚯蚓糊在-35℃将压力0Pa保持2小时之后,升温至温度25℃,在40Pa下以10小时,接着在40℃、压力35Pa下以14小时,之后在65℃、压力35Pa下以12小时进行干燥,最后将温度设为80℃,在压力25Pa下保持6小时,由此进行真空冷冻干燥,得到蚯蚓干燥粉末A-1。

[0095] [大鼠海马神经元培养]

[0096] 将从妊娠第18天大鼠胎儿的海马区域分离的神经细胞(神经元)在37℃培养7天。

[0097] [Tau蛋白量及磷酸化Tau蛋白量测定]

[0098] 将在上述已培养的大鼠海马神经元以上述中得到的蚯蚓干燥粉末A-1分别成为0、1、10、100及1000ng/mL的方式在培养液Neural Media5 (NM5) 中溶解而得到的蚯蚓冷冻干燥粉末溶解培养液1mL中(细胞数 1×10^6 /12孔盘),于37℃进行培养。培养液NM5的组成如下所述。

[0099] 230mL Neurobasal (Gibco 21103-049)

[0100] 12.5mL马血清(Horse Serum) (Sigma H1270)

[0101] 2.5mL青霉素/链霉素(penicillin/streptomycin) (Gibco 15140122)

[0102] 5mL Glutamax 1 (Gibco 35050-061)

[0103] 2% B27补充物(supplement) (Gibco 17504044)

[0104] 之后,在经过任意的时间后采集大鼠海马神经元,用PBS液(-)液清洗2次,用样品缓冲液进行调整后,利用蛋白质印迹法评价Tau蛋白量及Tau蛋白的磷酸化量。蛋白量及磷酸化量由蛋白质印迹的结果使用图像解析软件ImageJ64进行测定。同样地,关于与Tau蛋白相比位于信号上游的分子Akt及GSK-3β,也评价蛋白量及磷酸化量。

[0105] 对于蚯蚓干燥粉末溶解培养液中进行了培养的大鼠海马神经元,未确认到AKt及GSK-3 β 的蛋白量显著的增加(图1、图2的B及图2的C),但可知,Tau蛋白量增加,与对照(“-”;培养液NM5中培养)相比产生2倍以上的蛋白量(图1、图2的A)。另外,由蚯蚓干燥粉末溶解培养液引起的Tau蛋白量的增加在蚯蚓干燥粉末浓度100ng/mL、培养时间48小时显示最大的增加量(图3、4)。

[0106] [Tau蛋白及磷酸化Tau蛋白的细胞内局部存在]

[0107] 在将上述中培养的大鼠海马神经元以上述中得到的蚯蚓干燥粉末A-1成为100ng/mL的方式用培养液NM5溶解而得到的溶液2m1中(细胞数 2×10^5 /6孔盘(底面上盖玻片)),于37℃进行培养。

[0108] 之后,在48小时后采集大鼠海马神经元,用4%低聚甲醛固定,通过免疫染色法研究Tau蛋白及磷酸化Tau蛋白的细胞内局部存在。

[0109] 对于对照(“无”;用培养液NM5培养),直至神经突部位能够确认Tau蛋白的磷酸化鲜明,但对于用溶解有蚯蚓干燥粉末的培养液进行了培养的海马神经元,在突起部位无法确认鲜明的磷酸化图像(图5)。

[0110] 由以上的结构可知,蚯蚓干燥粉末使Tau蛋白的蛋白量显著增加,尤其在神经突部位减少磷酸化量。

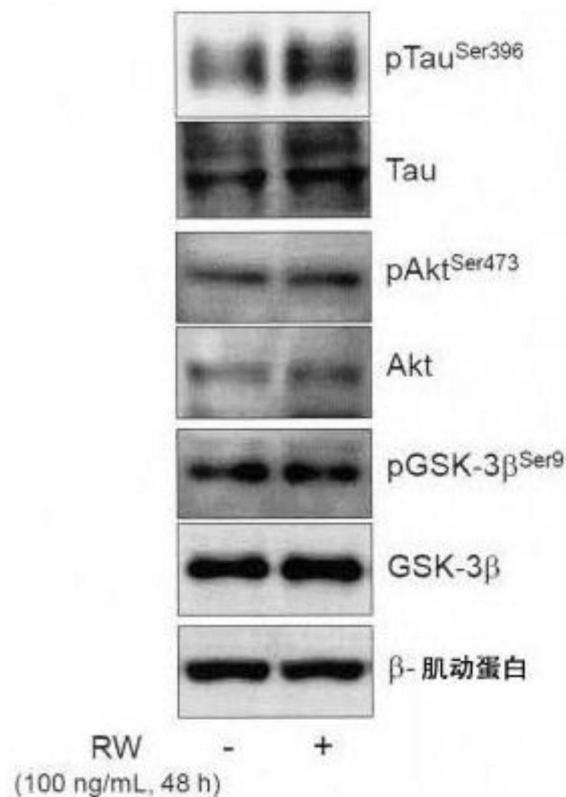


图1

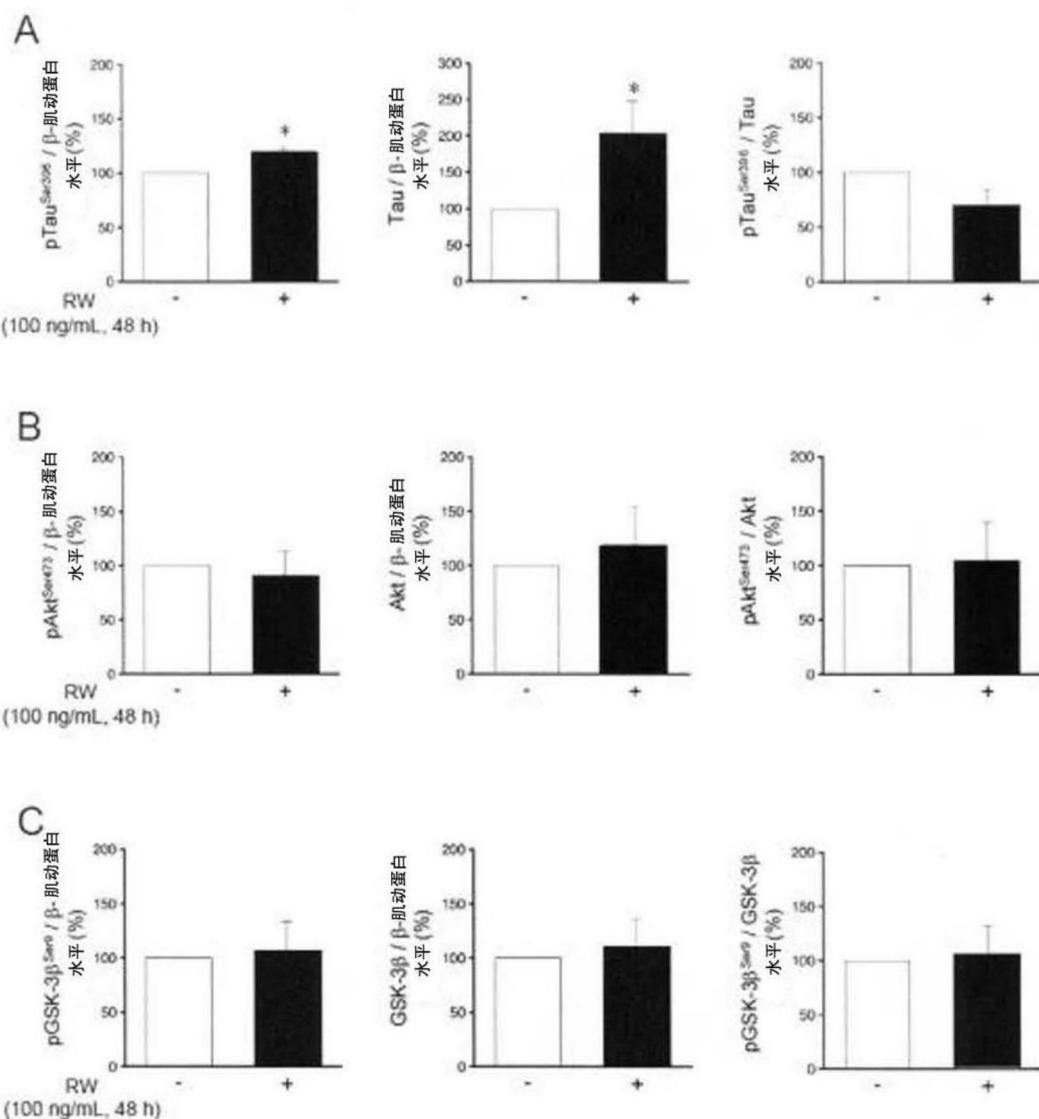


图2

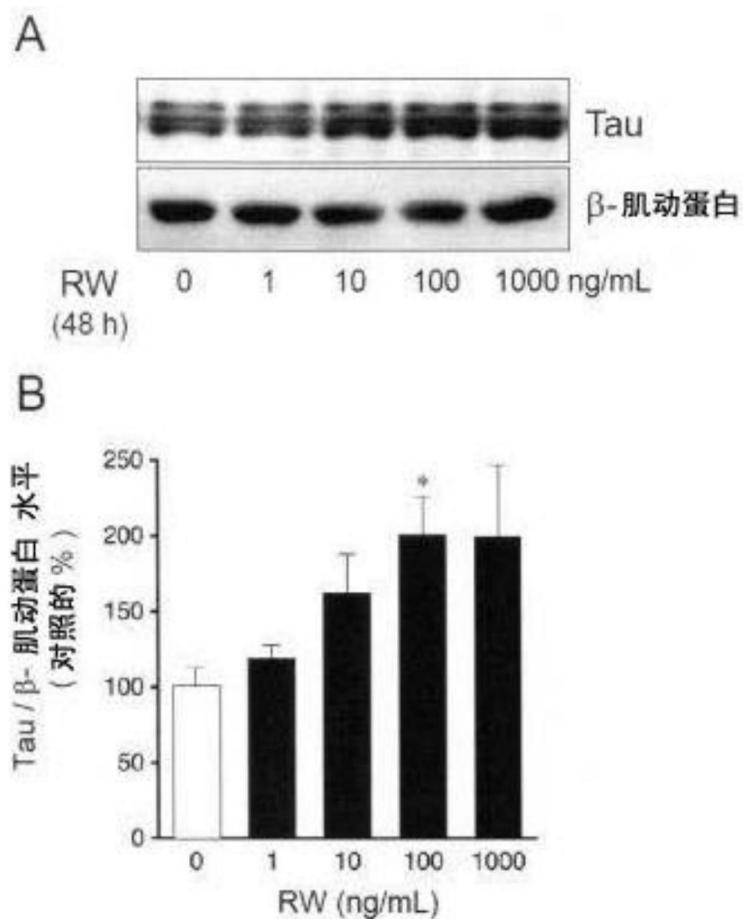


图3

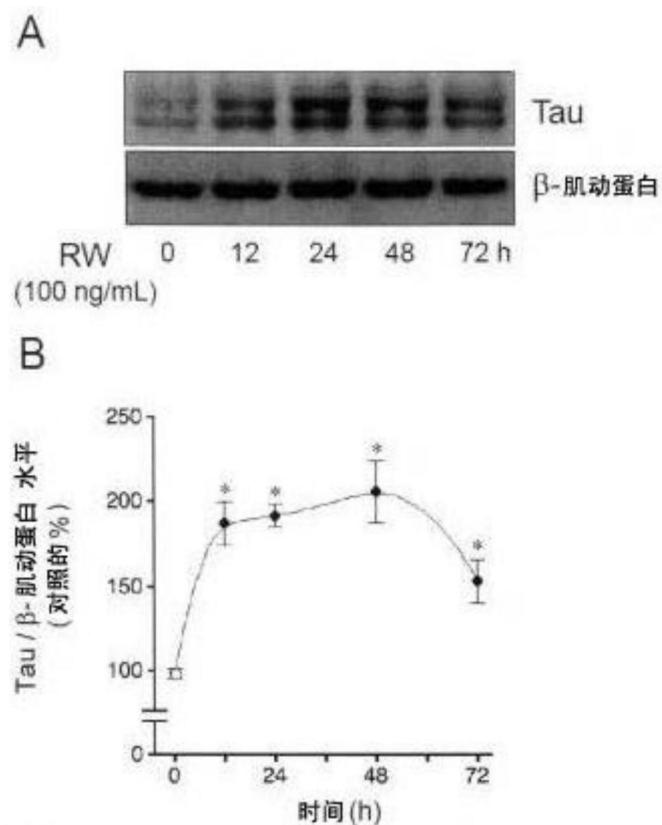


图4

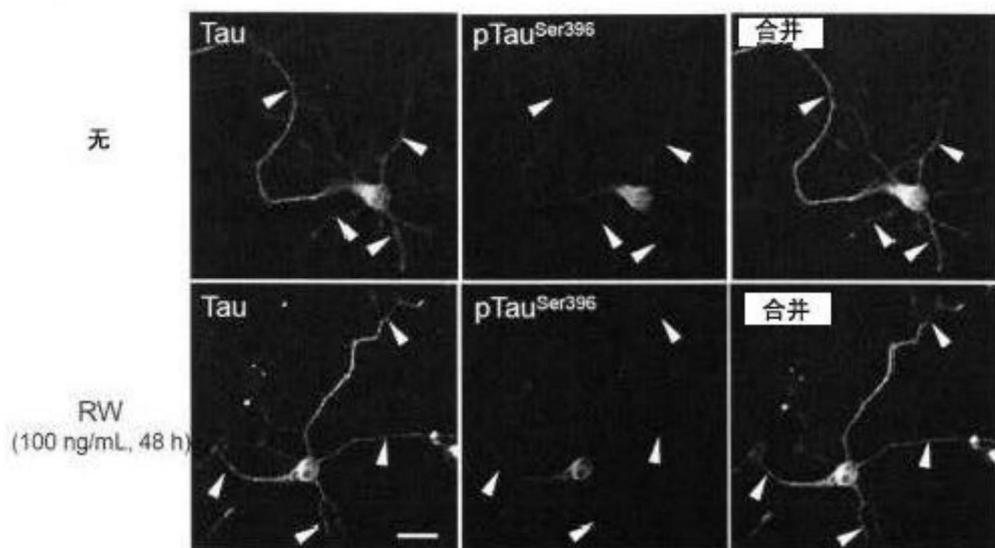


图5