

(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2020-176086

(P2020-176086A)

(43) 公開日 令和2年10月29日(2020.10.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/56 (2015.01)	A 6 1 K 35/56	4 B 0 6 4
A 6 1 K 35/57 (2015.01)	A 6 1 K 35/57	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/618 (2015.01)	A 6 1 K 35/618	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-78994 (P2019-78994)	(71) 出願人	599035339
(22) 出願日	平成31年4月18日 (2019.4.18)		株式会社 レオロジー機能食品研究所
			福岡県糟屋郡久山町大字久原2241-1
		(74) 代理人	100120086
			弁理士 ▲高▼津 一也
		(72) 発明者	藤野 武彦
			福岡県福岡市東区名島5丁目31番17号
		(72) 発明者	馬渡 志郎
			福岡県福岡市東区香椎浜4-7-1-12
			O 3
		Fターム(参考)	4B064 AE63 CA10 CE08 DA01
			4C087 AA01 AA02 AA03 BB13 BB16
			BB33 NA14 ZA02 ZB11

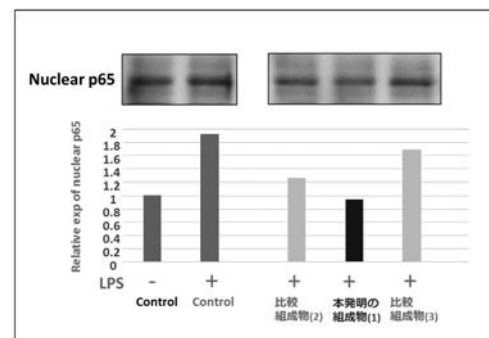
(54) 【発明の名称】 脳神経炎症抑制組成物の製造方法

(57) 【要約】

【課題】動物組織からプラズマローゲンを効率的に抽出し、特に脳神経炎症抑制に効果のある組成物を得ることができる方法を提供すること。

【解決手段】プラズマローゲンを含む動物組織をプロテアーゼで処理する酵素処理工程と、プロテアーゼで処理した動物組織を、エタノールを含む抽出液で抽出するエタノール抽出工程とを有する脳神経炎症抑制組成物の製造方法である。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

プラズマローゲンを含む動物組織をプロテアーゼで処理する酵素処理工程と、
前記プロテアーゼで処理した動物組織を、エタノールを含む抽出液で抽出するエタノール抽出工程と、
を有することを特徴とする脳神経炎症抑制組成物の製造方法。

【請求項 2】

動物組織が、ホタテ類、ホヤ及び鳥類から選ばれる動物の組織であることを特徴とする請求項 1 記載の脳神経炎症抑制組成物の製造方法。

【請求項 3】

プロテアーゼが、中性プロテアーゼであることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の脳神経炎症抑制組成物の製造方法。

10

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、動物組織からプラズマローゲン等の有効成分を抽出して、脳神経炎症の抑制に有効な組成物を製造する方法に関する。

20

【背景技術】**【0002】**

リン脂質は、生体膜の構成成分として重要であるが、中でもエーテルリン脂質であるプラズマローゲンは、哺乳動物の生体膜のリン脂質の約 18% を占めている。このプラズマローゲンは、特に、脳神経、心筋、骨格筋、白血球、精子に多いことが知られている。

【0003】

プラズマローゲンは、ドコサヘキサエン酸やアラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸と多く結合しているため、これらの多価不飽和脂肪酸から産生するプロスタグランジンやロイコトリエンなどの細胞間シグナルの 2 次メッセンジャーの貯留所となっているだけでなく、細胞融合、イオン移送など重要な働きをしている。

30

さらに、プラズマローゲンのビニルエーテル結合（アルケニル結合）が、特に酸化ストレスに敏感であるため細胞の抗酸化の機能も果たしている。

【0004】

また、プラズマローゲンは、神経新生の促進作用や、リポポリサッカロイド（LPS）による神経炎症の抑制作用、脳内アミロイド β （ $A\beta$ ）タンパクの蓄積の抑制作用等が知られており、アルツハイマー病、パーキンソン病、うつ病、統合失調症などの脳神経病において効果があるといわれている。

【0005】

従来より、このようなプラズマローゲンを動物組織から抽出する試みがなされている（特許文献 1 及び 2）。例えば、特許文献 1 においては、レイヤーのムネ肉に対してエタノールを抽出溶媒として抽出処理し、抽出液を回収する方法が提案されている。

40

【0006】

また、特許文献 2 においては、動物組織に対して、エタノール抽出処理を行い、エタノール抽出物を得、エタノール抽出物をホスホリパーゼ A1（PLA1）で処理し、ジアシル型グリセロリン脂質を加水分解し、さらに水溶性ケトン系溶剤で処理し、不溶部を回収し、不溶部を、脂肪族炭化水素溶剤と水溶性ケトン溶剤との混合有機溶剤、及び水で溶媒分配し、混合有機溶剤部を回収する方法が提案されている。

【先行技術文献】**【特許文献】****【0007】**

50

【特許文献 1】特許第 5 4 8 3 8 4 6 号公報

【特許文献 2】特許第 5 4 8 9 4 3 9 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

上記のように、有用なプラズマローゲンを動物組織から得ようとする試みはされているものの、必ずしも効率よくプラズマローゲンを得ることができているとはいえない。

【0009】

本発明の課題は、動物組織からプラズマローゲンを効率的に抽出し、特に脳神経炎症抑制に効果のある組成物を得ることができる方法を提供することにある。

10

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、動物組織からプラズマローゲンを効率的に抽出し、アルツハイマー病等の脳神経炎症に有効な組成物を得るべく鋭意検討した結果、プラズマローゲンを含む動物組織をプロテアーゼにより処理した後、エタノールで抽出することにより、多量のプラズマローゲンを抽出でき、しかも、脳神経炎症抑制に極めて有効な組成物を得ることができることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0011】

すなわち、本発明は、以下のとおりのものである。

20

[1] プラズマローゲンを含む動物組織をプロテアーゼで処理する酵素処理工程と、前記プロテアーゼで処理した動物組織を、エタノールを含む抽出液で抽出するエタノール抽出工程と、を有することを特徴とする脳神経炎症抑制組成物の製造方法。

[2] 動物組織が、ホタテ類、ホヤ及び鳥類から選ばれる動物の組織であることを特徴とする [1] 記載の脳神経炎症抑制組成物の製造方法。

[3] プロテアーゼが、中性プロテアーゼであることを特徴とする [1] 又は [2] 記載の脳神経炎症抑制組成物の製造方法。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、動物組織からプラズマローゲンを効率的に抽出することができ、脳神経炎症の抑制に極めて有効な組成物を得ることができる。

30

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図 1】マウス由来ミクログリア細胞 (M G 6 及び B V 2) における L P S 誘発性炎症シグナルに対する実施例で調製した本発明の組成物の炎症抑制効果を示す図である。

【図 2】実施例 2 におけるリン脂質の分析条件を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明の脳神経炎症抑制組成物の製造方法は、プラズマローゲンを含む動物組織をプロテアーゼで処理する酵素処理工程と、プロテアーゼで処理した動物組織を、エタノールを含む抽出液で抽出するエタノール抽出工程とを有することを特徴とする。

40

【0015】

本発明の製造方法においては、酵素処理工程及びエタノール抽出工程の前後に他の工程を有していてもよい。ただし、エタノール抽出工程前 (特にプロテアーゼで処理すると同時又は処理の後) に脂質分解酵素で処理する工程を有することは、脳神経炎症の抑制効果の減少のおそれがあるため、脂質分解酵素で処理する工程は有していないことが好ましい。

【0016】

[酵素処理工程]

酵素処理工程は、プラズマローゲンを含む動物組織をプロテアーゼで処理する工程である。

50

動物組織としては、ブラズマローゲンを含む動物組織であれば特に制限されるものではなく、ホタテ類、ホヤ、ナマコ、アワビ、サケ、サンマ、カツオ等の水産動物や鳥類等を挙げることができ、これらの中でも、ホタテ類、ホヤ、鳥類が好ましく、用いる部位としては、食用部位（可食部位）が好ましい。

【0017】

本発明におけるホタテ類は、イタヤガイ科に属する食用の二枚貝をいい、例えば、Mizuhopecten属、Pecten属に属するものを挙げることができる。具体的には、日本で採取されるホタテガイ（学名：Mizuhopecten yessoensis）や、ヨーロッパで採取されるヨーロッパホタテ（学名：Pecten maximus（Linnaeus））等を挙げることができる。食用部位としては、貝柱、ひも等を挙げることができる。

10

【0018】

本発明におけるホヤは、マボヤ科に属する食用の脊索動物をいい、マボヤ属、アカボヤ属に属するものを挙げることができる。具体的には、マボヤ（学名：Halocynthia roretzi）や、アカボヤ（学名：Halocynthia aurantium）等を挙げることができる。食用部位としては、身の部分（筋膜体）を挙げることができる。

【0019】

本発明における鳥類は、食用の鳥類であれば特に制限されるものではなく、例えば、鶏、烏骨鶏、鴨等を挙げることができる。食用部位としては、ブラズマローゲンを豊富に含むムネ肉が好ましい。

【0020】

これらの動物組織は、切断物であってもよいが、より効率的にブラズマローゲンを抽出できることから、粉碎物を用いることが好ましい。

20

【0021】

酵素処理に用いるプロテアーゼとしては、Aspergillus属、Rhizopus属等の糸状菌由来のプロテアーゼや、Bacillus属等の細菌由来のプロテアーゼや、パパイヤ、パイナップル等の植物から抽出されたプロテアーゼを挙げることができ、市販のプロテアーゼ剤を用いることができる。これらの中でも、糸状菌由来のプロテアーゼが好ましく、麹菌由来のプロテアーゼが特に好ましい。また、ブラズマローゲンは酸性、塩基性では不安定であることから、pH 4～10程度の環境下で酵素処理することが好ましく、少なくとも中性プロテアーゼを含む酵素を用いることが好ましい。

30

【0022】

プロテアーゼの使用量としては、例えば、動物組織100gに対して、0.1～10.0g程度であることが好ましく、0.2～8.0g程度であることがより好ましく、0.3～5.0g程度であることがさらに好ましい。

【0023】

[エタノール抽出工程]

エタノール抽出工程においては、プロテアーゼで処理した動物組織を、エタノールを含む抽出液で抽出する。

【0024】

エタノール抽出工程で用いるエタノールを含む抽出液としては、含水エタノールであってもよく、エタノールと他の有機溶媒との混合物であってもよい。エタノール濃度としては、50質量%以上であることが好ましく、80質量%以上であることがより好ましく、95質量%以上であることがさらに好ましく、実質的に100質量%であることが特に好ましい。

40

【0025】

エタノールの使用量としては、例えば、動物組織100gに対して、100～3000mL程度であることが好ましく、200～2000mL程度であることがより好ましく、250～1000mL程度であることがさらに好ましい。なお、エタノールを用いた抽出は複数回行ってよい。

【0026】

50

エタノール抽出処理を行った後、固形分を除去して抽出液を回収し、必要に応じて乾燥固化することにより、本発明のプラズマローゲンを含有した組成物を得ることができる。

【0027】

また、このエタノール抽出物に対して、プラズマローゲンの濃度を高める濃縮処理を施してもよい。例えば、エタノール抽出工程後に、親油性溶媒を含む抽出液で抽出する親油性溶媒抽出工程を有することが好ましい。親油性溶媒としては、例えば、脂肪族炭化水素や芳香族炭化水素を挙げることができ、ヘキサン、イソプロパノール、又はこれらの混合物が特に好ましい。

【0028】

本発明の製造方法により得られる組成物中に含まれるプラズマローゲンの量としては、 $0.001 \sim 100 \text{ mg/g}$ (wet重量換算)であることが好ましく、 $0.1 \sim 10 \text{ mg/g}$ であることがより好ましい。

10

【0029】

本発明のプラズマローゲンを含有した組成物は、食品、医薬品等として、又はこれらに含有させて用いることができる。食品としては、一般食品の他、特定保健用食品、栄養補助食品、機能性食品、サプリメント等を挙げることができる。本発明の組成物は、脳神経炎症の抑制に特に有効であることから、本発明の組成物又はこれを含む食品等は、アルツハイマー病等の認知症、パーキンソン病、うつ病、統合失調症などの脳神経病の予防又は改善に役立つ。

20

【0030】

食品、医薬品の形態は特に制限されるものではなく、例えば、錠状、カプセル状、粉末状、顆粒状、液状、粒状、棒状、板状、ブロック状、固形状、丸状、ペースト状、クリーム状、カプレット状、ゲル状、チュアブル状、スティック状等を挙げることができる。

【実施例1】

【0031】

[ホタテ抽出物の調製1]

次の手順により、ホタテガイ(学名:Mizuhopecten yessoensis)から本発明の組成物を得た。

【0032】

1. 素材(生ホタテヒモ) 200 g を解凍し、ハサミで細かく切った。
2. コクラゼ(登録商標)・P顆粒(起源Aspergillus oryzae)[三菱ケミカルフーズ株式会社製] 1.0 g を加えた。
3. ブレンダーで粉砕した($10 \text{ 秒} \times 2 \text{ 回}$)。
4. 攪拌機を使用して 50°C で 30 分 反応させた。
5. エタノール 800 mL を加えた。
6. ブレンダーで粉砕した($10 \text{ 秒} \times 2 \text{ 回}$)。
7. 50°C で 20 分 攪拌した。
8. 吸引ろ過した。
9. ろ液をロータリーエバポレーターで乾固した。

30

【0033】

10. ヘキサン/イソプロパノール(3:2)を 500 mL 加え混和した。
11. 水 250 mL を加え混和した。
12. 分液ロートに移してよく混和した。
13. 10 分 静置した。
14. 下層(水層)を取り N_2 ガスで乾固した。
→このステップで得られた組成物(アミノ酸+その他水溶性成分)を比較組成物(3)とした。
15. 上層(ヘキサン層)を取り N_2 ガスで乾固した。
→このステップで得られた組成物(pI-PE+その他脂質)を本発明の組成物(1)とした。

40

【0034】

50

[ホタテ抽出物の調製 2 (プロテアーゼ及びホスホリパーゼを用い、かつエタノール抽出を行わない場合 (比較例))]

- 1 . 0 . 1 M クエン酸溶液 (p H 4 . 5) 5 0 m L にコクラーゼ P 0 . 5 g とホスホリパーゼ A 1 (P L A 1) 0 . 8 g を加え混和した。
- 2 . 素材 (生ホタテヒモ) 2 0 0 g を解凍し、ハサミで細かく切った。
- 3 . 1 . を加え混和し、ブレンダーで粉碎した (1 0 秒 × 3 回) 。
- 4 . 5 0 で 1 時間反応させた (1 5 分おきにガラス棒で混和した) 。
- 5 . ヘキサン / イソプロパノール (3 : 2) 1 0 0 0 m L を加えた。
- 6 . 室温で 1 0 分撈拌した。
- 7 . 上澄みを吸引ろ過した。
- 8 . ヘキサン / イソプロパノール (3 : 2) 2 0 0 m L で洗い、再び吸引ろ過した。
- 9 . ろ液を分液ロートに移した。

10

【 0 0 3 5 】

- 1 0 . 硫酸ナトリウム水溶液 8 0 0 m L を加えてよく混和した。
- 1 1 . 1 0 分静置した。
- 1 2 . 下層を捨てた。
- 1 3 . 上層をロータリーエバポレーターで乾固した。
- 1 4 . ヘキサン 4 m L を加え超音波しよく懸濁し、遠沈管に移した。
- 1 5 . アセトン (4) 4 0 m L を加え混和した。
- 1 6 . - 3 0 に 1 時間から 1 晩放置した。
- 1 7 . 3 0 0 0 r p m , 1 0 m i n , 4 で遠心した。
- 1 8 . 上清を捨て、沈殿を回収した。
- 1 9 . デシケータで一晩乾燥した。

20

→ このステップで得られた組成物 (p l - P E + p l - P C + C A E P + C h o l e s t e r o l) を比較組成物 (2) とした。なお、p l - P C は、コリンプラズマローゲンであり、CAEP は、セラミドアミノエチルホスホン酸である。

【 0 0 3 6 】

[本発明の組成物の炎症抑制作用の確認]

炎症時、主にミクログリア細胞において炎症因子 N F - k B のサブユニットである p 6 5 タンパク質が核内に移行し、I L - 1 b e t a や T N F - a l p h a などの炎症性サイトカインを誘導する。リボポリサッカロイド (L P S) は、核内の p 6 5 発現を増加させることにより炎症性シグナルを誘発する。本実施例では、マウス由来ミクログリア細胞 (M G 6 及び B V 2) における L P S 誘発性炎症シグナルに対する本発明の組成物の効果を検証した。

30

具体的なプロトコールは、以下のとおりである。

【 0 0 3 7 】

- 1 . 組成物 (1) ~ (3) を水に溶解させた。
- 2 . マウス由来ミクログリア細胞 (M G 6 及び B V 2) を、組成物が添加又は無添加の状態の 2 % 血清 D M E M メディアで一晩培養した。なお、組成物を添加したメディアについては、それぞれ同量 (5 μ g / m L) の活性プラズマローゲンが含まれるように調製した。
- 3 . その後、L P S (1 μ g / m l) を加え、6 時間処理した。

40

なお、評価対象は、L P S 無添加の「コントロール L P S - 」、L P S を添加した「コントロール L P S + 」、「本発明の組成物 (1) L P S + 」、「比較組成物 (2) L P S + 」、「比較組成物 (3) L P S + 」の 5 種とした。

【 0 0 3 8 】

- 4 . 6 時間後、細胞採取、細胞分画により核を抽出した。
- 5 . 核抽出物を用いウエスタンブロットを行い、炎症マーカーである p 6 5 タンパク質を検出した。
- 6 . このタンパク発現の確認により、ミクログリア細胞において、組成物 (1) ~ (3)

50

が L P S 誘発性炎症シグナル（核内の p 6 5 発現）を軽減するかどうかを検証した。その結果を図 1 に示す。

【 0 0 3 9 】

図 1 に示すように、本発明の組成物（ 1 ）及び比較組成物（ 2 ）は、リボポリサッカロイド（ L P S ）により誘発される炎症を顕著に抑制し、その抑制効果は、比較組成物（ 2 ）よりも本発明の組成物（ 1 ）の方が優れていた。

【 実施例 2 】

【 0 0 4 0 】

次の手順により、各素材（ホタテ類の食用部位・鳥類の食用部位・ホヤの食用部位）からプラズマローゲンを含む組成物を抽出し、分析を行った。具体的に、ホタテ類としては、ホタテガイ（学名：Mizuhopecten yessoensis）のひもを用いた。鳥類としては、鶏の胸肉を用いた。ホヤとしては、マボヤ（学名：Halocynthia roretzi）の身（筋膜体）を用いた。

【 0 0 4 1 】

- 1．素材（ホタテ・鶏胸肉・ホヤ） 5 0 g を解凍し、ハサミで細かく切った。
- 2．次の試験溶液を準備した。
 - a) 0．1 M クエン酸溶液（pH 4．5） 5 0 m L のみ
 - b) 0．1 M クエン酸溶液（pH 4．5） 5 0 m L + コクラーゼ（登録商標）・ P 顆粒（起源Aspergillus oryzae）[三菱ケミカルフーズ株式会社製] 0．2 5 g
 - c) 10 m M T r i s - H C l B u f f e r （pH 7．4） 5 0 m L + プロテアーゼ P 「アマノ」 3 S D （起源Aspergillus 属）[天野エンザイム株式会社製] 0．2 5 g
 - d) 10 m M T r i s - H C l B u f f e r （pH 7．4） 5 0 m L + プロチン S D - N Y 1 0 （起源Bacillus 属）[天野エンザイム株式会社製] 1．2 5 g

【 0 0 4 2 】

- 3．素材と上記 a) ~ d) の各試験溶液とを混合し、ブレンダー（WARING社製HGBSS）で粉砕した（ 1 0 秒 × 3 回）。
- 4．5 0 で 6 0 分間反応させた（約 1 5 分おきにガラス棒で攪拌した）。
- 5．エタノール 2 5 0 m L を加え、ブレンダーに入れ粉砕した（ 1 0 秒 × 2 回）。
- 6．3 0 分放置した（約 5 分ごとにガラス棒で 1 0 回転攪拌した）。
- 7．吸引ろ過し、ろ液を回収した。

【 0 0 4 3 】

- 8．ろ液を 1 m L スピッツ管に取り、リン脂質の分析に用いた。
- 9．残りのろ液をエバポレーターで乾固させ、総脂質重量を測定した。

【 0 0 4 4 】

各分析結果を以下に示す。

（ 1 ）総脂質重量

上記 a) ~ d) の試験溶液を用いた抽出物の総脂質重量（ g / 素材 5 0 g 当たり）を表 1 に示す。

【 0 0 4 5 】

【 表 1 】

g/素材 50 g あたり	ホタテ	鶏胸肉	ホヤ
a) プロテアーゼなし	3.76	2.49	4.28
b) コクラーゼ P	5.52	4.54	5.95
c) プロテアーゼ-アマノ 3SD	5.95	4.69	6.23
d) プロチン SD-NY10	6.35	5.61	6.74

【 0 0 4 6 】

(2) リン脂質の分析条件(図2参照)におけるプラズマローゲン(pl-PE+pl-PC)の割合(HPLC面積値)を表2に示す。

【0047】

【表2】

	ホタテ	鶏胸肉	ホヤ
a)プロテアーゼなし	47.3	21.8	40.8
b)コクラーゼP	52.1	22.9	42.0
c)プロテアーゼ-アマノ3SD	48.6	21.0	39.4
d)プロチンSD-NY10	48.3	19.8	42.9

10

【0048】

(3) プロテアーゼ処理によるプラズマローゲン(pl-PE+pl-PC)の増加率

上記(1)で求めた総脂質量に、上記(2)で求めたプラズマローゲン(pl-PE+pl-PC)の割合をかけた数値を算出し、「a)プロテアーゼなし」を基準(1.0)として、プラズマローゲン(pl-PE+pl-PC)の量を比較した。その結果を表3に示す。

なお、総脂質全体に占めるリン脂質の割合は、プロテアーゼ処理を施してもほぼ変化はなかった。

20

【0049】

【表3】

	ホタテ	鶏胸肉	ホヤ
a)プロテアーゼなし	1.0	1.0	1.0
b)コクラーゼP	1.6	1.9	1.4
c)プロテアーゼ-アマノ3SD	1.6	1.8	1.4
d)プロチンSD-NY10	1.7	2.0	1.7

30

【0050】

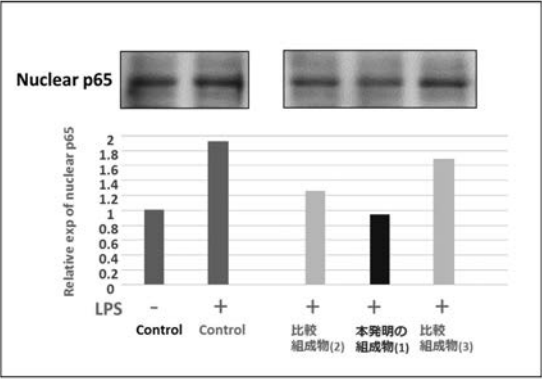
表3に示すように、プロテアーゼ処理を施すことにより、プラズマローゲンの抽出量が飛躍的に増加することがわかる。したがって、プロテアーゼ処理を施した組成物は、脳神経炎症抑制組成物として有用であると考えられる。

【産業上の利用可能性】

【0051】

本発明の製法により製造される脳神経炎症抑制組成物は、健康食品等に用いることができることから、産業上有用である。

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.

C 1 2 P 9/00 (2006.01)

F I

C 1 2 P 9/00

テーマコード (参考)