



(10) 授权公告号 CN 113873895 B

(45) 授权公告日 2024. 10. 11

(21) 申请号 202080037969.X

(22) 申请日 2020.05.19

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113873895 A

(43) 申请公布日 2021.12.31

(30) 优先权数据
2019-095658 2019.05.22 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.11.22

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2020/019742 2020.05.19

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/235546 JA 2020.11.26

(73) 专利权人 日东富士制粉株式会社
地址 日本东京都

(72) 发明人 高木阳平 平贺由水香
今井伸二郎 仓科瑛衣 高柳雅义
佐佐木康人 大岛秀男 小泉武嗣

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002
专利代理师 张晶 谢顺星

(51) Int.Cl.
A23K 20/111 (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01)
A23K 20/158 (2016.01)
A23L 33/12 (2016.01)
A61K 31/05 (2006.01)
A61K 36/899 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

(56) 对比文件
KR 1020220049790 A, 2022.04.22
Alastair B. Ross等.Cereal
Alkylresorcinols Elevate-Tocopherol
Levels in Rats and Inhibit-Tocopherol
Metabolism In Vitro.Journal of
Nutrition.2004,第134卷(第3期),506-510.

审查员 张仙

权利要求书1页 说明书11页
序列表4页 附图6页

(54) 发明名称
肝功能改善用组合物

(57) 摘要
本发明提供一种利用源自植物的间苯二酚性油脂从而例如对非酒精性肝炎的症状的改善有用的肝功能改善用组合物。作为肝功能改善用组合物的有效成分,使用源自植物的间苯二酚性脂质。间苯二酚性脂质优选为烷基间苯二酚。此外,优选源自禾本科植物。此外,优选源自小麦和/或黑麦的糠麸类和/或全谷粒。该肝功能改善用组合物特别适合用于改善非酒精性肝炎的症状。

1. 源自植物的间苯二酚性脂质在肝功能改善用组合物的制备中的应用,其中,所述间苯二酚性脂质包含烷基间苯二酚,所述肝功能改善用组合物用于改善肝炎的症状。
2. 根据权利要求1所述的应用,其中,所述间苯二酚性脂质源自禾本科植物。
3. 根据权利要求1或2所述的应用,其中,所述间苯二酚性脂质源自小麦和/或黑麦的糠麸类和/或全谷粒。
4. 根据权利要求1或2所述的应用,其中,包含所述烷基间苯二酚的所述间苯二酚性脂质由含有间苯二酚性脂质的植物的溶剂提取物组成。
5. 根据权利要求4所述的应用,其中,所述溶剂为乙醇和/或己烷。
6. 根据权利要求1或2所述的应用,其中,所述肝功能改善用组合物用于改善非酒精性肝炎的症状。
7. 根据权利要求1或2所述的应用,其中,所述肝功能改善用组合物用于抑制由非酒精性肝炎导致的肝的中性脂肪蓄积。
8. 根据权利要求1或2所述的应用,其中,所述肝功能改善用组合物以饮食品、食品添加剂、药物、营养补充剂或动物饲料的形式提供。

肝功能改善用组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用了源自植物的成分的肝功能改善用组合物。

背景技术

[0002] 间苯二酚性脂质为通过在间苯二酚(1,3-二羟基苯)的芳香环的2位、4位、5位和/或6位具有烷基而得到的亲油性物质。在天然中,多被包含于禾本科植物的种子尤其是其外皮(麸)、银杏叶、腰果壳油等中。近年来,针对该间苯二酚性脂质,例如有报告指出其具有口腔用抗菌、免疫抑制、抗糖尿病、抗炎症、调节肠道菌群、抗胆固醇、抗肥胖、改善睡眠、抑制老化、调整昼夜节律等对人的各种功能性(例如专利文献1~10)。

[0003] 现有技术文献

[0004] 专利文献

[0005] 专利文献1:日本专利第2613474号公报

[0006] 专利文献2:日本特开2013-091612号公报

[0007] 专利文献3:日本专利2014-139166号公报

[0008] 专利文献4:日本专利2015-020993号公报

[0009] 专利文献5:日本专利2015-218130号公报

[0010] 专利文献6:日本专利2015-231986号公报

[0011] 专利文献7;日本专利2016-132641号公报

[0012] 专利文献8:日本专利2016-153387号公报

[0013] 专利文献9:日本专利第5926616号公报

[0014] 专利文献10:日本专利第5951448号公报

发明内容

[0015] 本发明要解决的技术问题

[0016] 然而,以往没有报告指出源自植物的间苯二酚性油脂具有改善肝功能的效果。

[0017] 本发明的目的在于提供一种利用源自植物的间苯二酚性油脂从而例如对非酒精性肝炎的症状的改善有用的肝功能改善用组合物。

[0018] 解决技术问题的技术手段

[0019] 为了达成上述目的,就第一观点而言,本发明提供一种肝功能改善用组合物,其将源自植物的间苯二酚性脂质作为有效成分。

[0020] 在本发明的肝功能改善用组合物中,优选所述间苯二酚性脂质为烷基间苯二酚。

[0021] 此外,在该组合物中,优选所述间苯二酚性脂质源自禾本科植物。

[0022] 此外,在该组合物中,优选所述间苯二酚性脂质源自小麦和/或黑麦的糠麸类和/或全谷粒。

[0023] 此外,在该组合物中,优选该肝功能改善用组合物由含有间苯二酚性脂质的植物的溶剂提取物组成。

[0024] 此外,在该组合中,当该肝功能改善用组合由含有间苯二酚性脂质的植物的溶剂提取物组成时,优选所述溶剂为乙醇和/或己烷。

[0025] 此外,在该组合中,优选该肝功能改善用组合用于改善肝炎的症状。

[0026] 此外,在该组合中,优选该肝功能改善用组合用于改善非酒精性肝炎的症状。

[0027] 此外,在该组合中,优选该肝功能改善用组合用于抑制由非酒精性肝炎导致的肝的中性脂肪蓄积。

[0028] 此外,在该组合中,优选该肝功能改善用组合以饮食品、食品添加剂、药物、营养补充剂或动物饲料的形式提供。

[0029] 为了达成上述目的,就第二观点而言,本发明提供源自植物的间苯二酚性油脂在肝功能改善用组合的制备中的应用。

[0030] 在本发明的源自植物的间苯二酚性油脂的应用中,优选该间苯二酚性脂质为烷基间苯二酚。

[0031] 此外,在该应用中,优选所述间苯二酚性脂质源自禾本科植物。

[0032] 此外,在该应用中,优选所述间苯二酚性脂质源自小麦和/或黑麦的糠麸类和/或全谷粒。

[0033] 此外,在该应用中,优选所述肝功能改善用组合由含有间苯二酚性脂质的植物的溶剂提取物组成。

[0034] 此外,在该应用中,当所述肝功能改善用组合由含有间苯二酚性脂质的植物的溶剂提取物组成时,优选所述溶剂为乙醇和/或己烷。

[0035] 此外,在该应用中,优选所述肝功能改善用组合用于改善肝炎的症状。

[0036] 此外,在该应用中,优选所述肝功能改善用组合用于改善非酒精性肝炎的症状。

[0037] 此外,在该应用中,优选所述肝功能改善用组合用于抑制由非酒精性肝炎导致的肝的中性脂肪蓄积。

[0038] 此外,在该应用中,优选所述肝功能改善用组合以饮食品、食品添加剂、药物、营养补充剂或动物饲料的形式提供。

[0039] 发明效果

[0040] 根据本发明,能够提供一种利用源自植物的间苯二酚性油脂从而例如对非酒精性肝炎的症状的改善有用的肝功能改善用组合。

附图说明

[0041] 图1为示出对试验例2中各组的体重增加量在试验期间内的推移进行调查而得到的结果的图表。

[0042] 图2为示出对试验例2中各组的饲料摄入量在试验期间内的推移进行调查而得到的结果的图表。

[0043] 图3为示出对试验例3中各组的AST值在试验期间内的推移进行调查而得到的结果的图表。结果以各组(n=5~6)的平均值与其标准偏差表示。此外,利用Dunnett的多重比较检验法求出相对于对照组(C组)的统计学上的显著性差异,图中“*”表示显著性水平 $p < 0.05$ 、有显著性差异。

[0044] 图4为示出对试验例3中各组的ALT值在试验期间内的推移进行调查而得到的结果

的图表。结果以各组 ($n=5 \sim 6$) 的平均值与其标准偏差表示。此外,利用Dunnett的多重比较检验法求出相对于对照组 (C组) 的统计学上的显著性差异,图中“*”表示显著性水平 $p<0.05$ 、有显著性差异。

[0045] 图5为示出对试验例4中各组的肝组织中的中性脂肪量进行调查而得到的结果的图表。结果以各组 ($n=5 \sim 6$) 的平均值与其标准偏差表示。

[0046] 图6为示出利用HE染色对试验例5中各组的肝组织进行调查而得到的结果的图表。

[0047] 图7为示出对试验例6中各组的肝组织中的PPAR γ 基因的表达量进行调查而得到的结果的图表。结果以各组 ($n=5 \sim 6$) 的平均值与其标准偏差表示。

[0048] 图8A为示出对试验例7中各组的肝组织中的PGC-1 α 基因的表达量进行调查而得到的结果的图表。结果以各组 ($n=5 \sim 6$) 的平均值与其标准偏差表示。此外,利用Dunnett的多重比较检验法求出相对于对照组 (C组) 的统计学上的显著性差异,图中“*”表示显著性水平 $p<0.05$ 、有显著性差异。

[0049] 图8B为示出对试验例7中各组的肝组织中的PPAR α 基因的表达量进行调查而得到的结果的图表。结果以各组 ($n=5 \sim 6$) 的平均值与其标准偏差表示。此外,利用Dunnett的多重比较检验法求出相对于对照组 (C组) 的统计学上的显著性差异,图中“*”表示显著性水平 $p<0.05$ 、有显著性差异。

[0050] 图8C为示出对试验例7中各组的肝组织中的脂联素基因的表达量进行调查而得到的结果的图表。结果以各组 ($n=5 \sim 6$) 的平均值与其标准偏差表示。此外,利用Dunnett的多重比较检验法求出相对于对照组 (C组) 的统计学上的显著性差异,图中“*”表示显著性水平 $p<0.05$ 、有显著性差异。

[0051] 图9为示出通过线粒体DNA量相对于基因组DNA量的量比对试验例8中各组的肝组织的细胞内线粒体数进行评价而得到的结果的图表。结果以各组 ($n=5 \sim 6$) 的平均值与其标准偏差表示。此外,利用Dunnett的多重比较检验法求出相对于对照组 (C组) 的统计学上的显著性差异,图中“*”表示显著性水平 $p<0.05$ 、有显著性差异。

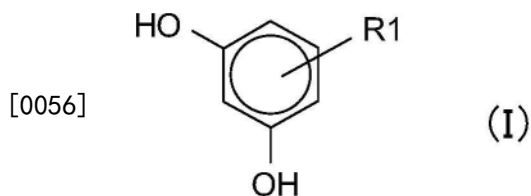
具体实施方式

[0052] 在本发明中,作为肝功能改善用组合物的有效成分,使用源自植物的间苯二酚性脂质。

[0053] 如上所述,间苯二酚性脂质为通过在间苯二酚 (1,3-二羟基苯) 的芳香环的2位、4位、5位和/或6位具有烷基而得到的亲油性物质。在天然中,常见于属于漆树科、银杏科、山龙眼科、紫金牛科、报春花科、肉豆蔻科、鸢尾科、天南星科、豆科、禾本科等的植物、菊科的艾蒿等。这些植物中,小麦、黑麦等禾本科植物的可食部分 (种子) 中包含比较丰富的间苯二酚性脂质,因此可适宜地用作用于本发明的间苯二酚性脂质的原料体。例如,小麦、黑麦等的可食部分 (种子) 的糠麸类或全谷粒中,包含0.015~0.3质量%左右的下述式 (I) 所表示的烷基间苯二酚化合物。另外,作为用于本发明的间苯二酚性脂质的优选的原料体,也可例示出以小麦或黑麦为原料的味噌等发酵物等。

[0054] 作为用于本发明的间苯二酚性脂质,典型地,可列举出下述式 (I) 所表示的烷基间苯二酚化合物。

[0055] [化学式1]



[0057] 式(I)中,R1表示饱和或不饱和的直链或支链烷基。R1所表示的烷基的碳原子数没有限制,但优选为1~27,更优选为3~27,进一步优选为5~27。

[0058] 式(I)中,优选R1为饱和或不饱和的直链烷基,更优选为饱和直链烷基。作为R1所表示的饱和直链烷基的实例,可列举出甲基、正丙基、正戊基、正庚基、正壬基、正十一烷基、正十三烷基、正十五烷基、正十七烷基、正十九烷基、正二十一烷基、正二十三烷基等。

[0059] 式(I)中,R1所表示的不饱和直链烷基的不饱和键的位置或数量没有特别限制。作为该不饱和直链烷基的实例,可列举出在上述饱和直链烷基的碳链上的任意位置具有不饱和键的烷基。

[0060] 式(I)中,R1所表示的饱和或不饱和的支链烷基的分支的位置或数量、或者不饱和键的位置或数量没有特别限制。

[0061] 作为上述式(I)化合物的优选实例,可列举出如下化合物。

[0062] 5-戊基间苯二酚[橄榄醇或1,3-二羟基-5-正戊基苯(C5:0)]

[0063] 5-庚基间苯二酚[或1,3-二羟基-5-正庚基苯(C7:0)]

[0064] 5-壬基间苯二酚[或1,3-二羟基-5-正壬基苯(C9:0)]

[0065] 5-十一烷基间苯二酚[或1,3-二羟基-5-正十一烷基苯(C11:0)]

[0066] 5-十三烷基间苯二酚[或1,3-二羟基-5-正十三烷基苯(C13:0)]

[0067] 5-十五烷基间苯二酚[或1,3-二羟基-5-正十五烷基苯(C15:0)]

[0068] 5-十七烷基间苯二酚[或1,3-二羟基-5-正十七烷基苯(C17:0)]

[0069] 5-十九烷基间苯二酚[或1,3-二羟基-5-正十九烷基苯(C19:0)]

[0070] 5-二十一烷基间苯二酚[或1,3-二羟基-5-正二十一烷基苯(C21:0)]

[0071] 5-二十三烷基间苯二酚[或1,3-二羟基-5-正二十三烷基苯(C23:0)]

[0072] 5-二十五烷基间苯二酚[或1,3-二羟基-5-正二十五烷基苯(C25:0)]

[0073] 5-二十七烷基间苯二酚[或1,3-二羟基-5-正二十七烷基苯(C27:0)]

[0074] 用于本发明的源自植物的间苯二酚性脂质例如可入手市售品并使用,或者可利用常规方法从植物中提取并使用。例如,上述式(I)化合物的市售品可从ReseaChem GmbH、SIGMA-ALDRICH等购入。

[0075] 作为从植物中提取的方法,可列举出在常压或加压下根据需要一边在室温或加温后的提取溶剂中搅拌上述原料体一边使其浸渍于溶剂的方法、或回流提取法等。在添加至提取溶剂前,可根据需要对上述原料体进行切断、粉碎、压榨、干燥或它们的组合。

[0076] 作为提取溶剂,可列举出甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇等低级醇,或1,3-丁二醇、丙二醇、甘油等多元醇等在室温下为液体的醇类;二乙醚、丙醚等醚类;乙酸丁酯、乙酸乙酯等酯类;丙酮、甲基乙基酮等酮类;己烷;以及氯仿等有机溶剂。上述溶剂可单独使用,也可组合使用2种以上。上述溶剂中,从操作性或对环境的影响等方面出发,优选使用在室温下为液体的醇类、例如碳原子数为1~4的低级醇,从残留溶剂的安全性的角度出发,更优选使用乙醇。

[0077] 作为提取溶剂,也可进一步包含在有机溶剂中包含水性成分的含水有机溶剂。从将提取效率保持得较高的角度出发,期望该含水有机溶剂中的水性成分的含量通常为50体积%以下,优选为30体积%以下,更优选为20体积%以下。作为含水有机溶剂,可优选地列举出于如上所述的在室温下为液体的醇类中包含水性成分的含水醇,更优选地列举出含水乙醇。

[0078] 用于提取的温度、时间等条件可根据所使用的提取溶剂的种类或提取条件等适当设定,优选提取温度为2~100℃,提取时间为30分钟~60小时左右。相对于100质量份的原料体,优选将提取溶剂的量设为200~2000质量份左右即可。此外,在提取处理后,可根据需要将包含提取液与残渣的混合物供于过滤或离心分离等,去除作为残渣的固体成分。进一步,也可将去除的固体成分再次供于使用了提取溶剂的提取操作,反复进行多次该操作。可使所得到的提取物通过液相色谱等,由此制备经进一步纯化的包含间苯二酚性脂质的提取物。以此方式进行纯化时,对于其纯化度,在任意方案中,以上述源自植物的间苯二酚性油脂的含量计,例如典型地可以为1质量%以上的范围,更典型地可以为5质量%以上的范围,进一步更典型地可以为10质量%以上的范围。此外,例如典型地可以为100质量%以下的范围,更典型地可以为90质量%以下的范围,进一步更典型地可以为80质量%以下的范围。所得到的提取物可以直接用于本发明,或者可以在根据需要进一步实施浓缩、冷冻干燥、热风干燥、粉碎、粉末化、分级、稀释、加水混合等处理后用于本发明。

[0079] 如后述的实施例所示,源自植物的间苯二酚性脂质具有改善肝功能的作用效果。本发明基于该间苯二酚性脂质的属性,提供一种肝功能改善用组合物。另外,“肝功能”例如可列举出非酒精性肝炎、酒精性肝炎、病毒性肝炎等肝炎的症状的改善。此外,除肝炎以外,也可列举出非酒精性肝病、脂肪肝、肝硬化等肝病的症状的改善。然而,本发明的肝功能改善用组合物的应用并不限于这些症状,可广泛地用于改善肝功能的目的。对于症状是否得到改善,例如可通过测定作为肝功能的一般性指标的血浆中的天冬氨酸氨基转移酶(AST)值或丙氨酸氨基转移酶(ALT)值等来进行评价。

[0080] 本发明的肝功能改善用组合物的给予量可根据适用的个体的种类、症状、年龄、性别等而适当变更。关于以人为对象时的给予量,通常可一天给一个成人给予0.01~10g的上述源自植物的间苯二酚性油脂。该一天的给予量可以一次给予,也可以分多次给予。此外,更优选口服给予。另外,适用对象并不限于人,例如还可以适用于狗、猫等动物用。

[0081] 本发明的肝功能改善用组合物的形态只要为可摄取上述源自植物的间苯二酚性油脂的形态即可,没有特别限制。例如,该形态可以为固体、半固体或液状,或者可以为片剂、咀嚼片、粉剂、胶囊、颗粒剂、饮用剂、凝胶剂、糖浆、管饲-肠道喂养用流食等各种形态等。此外,例如可以为健康食品、功能性饮食品、特定保健用饮食品、病人用饮食品等饮食品、用于该饮食品的食品添加剂、药物、营养补充剂、用于家畜、赛马、观赏动物、宠物等的动物饲料等形态。即,可通过含有上述源自植物的间苯二酚性油脂作为各形态的一部分,从而形成容易摄取的形态。另一方面,本发明的肝功能改善用组合物可以基本上由上述源自植物的间苯二酚性油脂构成。因此,例如在任意的形态中,以上述源自植物的间苯二酚性油脂的含量计,例如典型地可以为0.1质量%以上的范围,更典型地可以为0.5质量%以上的范围,进一步更典型地可以为1.0质量%以上的范围。此外,例如典型地可以为100质量%以下的范围,更典型地可以为90质量%以下的范围,进一步更典型地可以为80质量%以下的范

围。

[0082] 作为典型的药物的形态,例如可列举出片剂、胶囊剂、颗粒剂、散剂、糖浆剂、干糖浆剂、溶液剂、混悬剂等口服剂、吸入剂、经皮制剂、栓剂等经肠制剂、点滴剂、注射剂等非口服剂。上述溶液剂、混悬剂等液体制剂可以为在服用前才溶解或混悬于水或其他适当介质的形式,可以利用周知的方法对上述片剂及颗粒剂的表面进行涂布。此外,上述注射剂可以为根据需要包含溶解辅助剂的、上述源自植物的间苯二酚性油脂的灭菌蒸馏水或灭菌生理盐水的溶液或混悬液。

[0083] 在上述药物的形态中,可根据需要含有药学上可允许的各种载体,例如赋形剂、稳定化剂、其他添加剂等,或者可以进一步含有其他药效成分,例如各种维生素类、矿物质类、生药等。

[0084] 作为典型的饮食品的形态,可列举出绿茶、乌龙茶或红茶等茶饮料、咖啡饮料、清凉饮料、果冻饮料、运动饮料、乳饮料、碳酸饮料、果汁饮料、乳酸菌饮料、发酵乳饮料、粉末饮料、可可饮料、酒精饮料、矿泉水等饮料、黄油、果酱、日式香松、人造黄油等涂抹食品类、蛋黄酱、起酥油、奶油、调味品(dressing)类、面包类、米饭类、面类、意大利面、味噌汤、豆腐、牛奶、酸奶、汤或沙司类、点心(例如饼干或曲奇饼类、巧克力、糖果、蛋糕、冰淇淋、口香糖、压片糖果(tablet))等。

[0085] 在上述饮食品的形态中,可根据需要含有食品上可允许的其他饮食品材料、各种营养素、各种维生素、矿物质、氨基酸、各种油脂、各种添加剂(例如滋味成分、甜味剂、有机酸等酸味剂、表面活性剂、pH调节剂、稳定剂、抗氧化剂、色素、香精)等,或者也可以进一步含有其他药效成分,例如各种维生素类、矿物质类、生药等。

[0086] 作为典型的食品添加剂的形态,只要为可掺合于上文中例示的饮食品的组成或形态即可。

[0087] 作为典型的动物饲料的形态,除了动物用以外,还可以为大致以上文中例示的饮食品的组成或形态为基准的组成或形态。

[0088] 典型的营养补充剂的形态为上述形态中的口服用组合物。例如,可以为片剂、咀嚼片、粉剂、胶囊、颗粒剂、饮用剂、凝胶剂、糖浆等形态。

[0089] 实施例

[0090] 以下,列举实施例对本发明进行进一步详细的说明,但本发明并不限定于以下的实施例。

[0091] <制备例1>~烷基间苯二酚的制备~

[0092] 将黑麦麸(约9.4kg)减压干燥(80℃、16小时),向已干燥的原料中添加5倍量的99%乙醇,在加温下进行搅拌提取(60℃、1小时)。然后,进行固液分离得到滤液A,向其残渣中添加等量的99%乙醇,进一步进行冲洗后进行固液分离,得到滤液B。将得到的滤液A与滤液B合并,进行减压浓缩,得到516g的黑麦麸乙醇提取物。

[0093] 向463g的黑麦麸乙醇提取物中添加5.8L纯化水与5.8L的99%乙醇,在60℃的水浴上搅拌1小时后,添加696g的 α -环糊精,进一步搅拌、混合1小时。将其喷雾干燥,得到649g的喷雾干燥品,进一步进行粒度调整(过10目筛),得到639g的黑麦麸乙醇提取物干燥品。

[0094] 用2L已烷溶解上述干燥品,通过二氧化硅正相色谱进行纯化。色谱柱使用YAMAZEN CORPORATION制造的HI-FLASH COLUMN SILICA 5L目录编号:W007(色谱柱内径×色谱柱长:

60×180mm、填充剂量:250g)。将色谱条件设为流速为70mL/分钟、检测波长为280nm、流动相(9分钟的己烷/乙酸乙酯:90/10(v/v)→15分钟的80/20(v/v)→16分钟的60/40(v/v)的台阶梯度),分离出洗脱时间30分~40分期间的洗脱液。对分离物进行减压干燥,得到50g的干固体。

[0095] <试验例1>~利用高效液相色谱的分析~

[0096] 通过利用高效液相色谱的分析法,对制备例1中得到的干固体中的烷基间苯二酚的量进行定量。另外,以下有时将烷基间苯二酚称为“ARs”或“AR”。

[0097] 具体而言,使用GL Sciences Inc.的Inertsil ODS4作为分析色谱柱,作为分析条件,以流速1mL/分钟、检测波长275nm、色谱柱温度40℃、流动相(89v/v%甲醇→(5分钟)→92v/v%甲醇→(25分钟)→100%甲醇的梯度)实施。使用市售的橄榄醇(具有碳原子数为5的直链状的烷基链的AR:Sigma-Aldrich)作为烷基间苯二酚的标准品。对于烷基链长与橄榄醇不同的各AR的定量,预先确定洗脱位置,将各自的分子量除以橄榄醇的分子量而得到的值作为系数,用实际测定的峰面积乘以该系数从而换算得到。

[0098] 其结果,确认到制备例1中得到的干固体在50g的干固体中含有6.8g的ARs。

[0099] <试验例2>~使用肝炎模型小鼠的动物试验~

[0100] 在非酒精性脂肪肝模型小鼠(Charles River Laboratories Japan, Inc.制造, C57BL/6NASH雄性小鼠)为6周龄时将其移入笼中,然后经过2天的适应期,每笼饲养6只。小鼠的饲养在维持12小时间隔的光暗循环(光周期:上午8点~下午8点)的恒温恒湿箱中进行,在适应期后,使其自由摄取以下所示的与各试验组相应的饲料。

[0101] • 对照组(C组):未掺合受试物质的对照饲料

[0102] • 白藜芦醇摄取组(R组):掺合有0.4质量%的白藜芦醇(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)的饲料

[0103] • ARs高摄取组(AH组):掺合有0.9质量%的ARs的饲料

[0104] • ARs低摄取组(AL组):掺合有0.3质量%的ARs的饲料

[0105] 在试验期间内,每天进行一次体重的测定。此外,每周进行一次采血,由小鼠尾静脉进行采血而得到血浆。血浆在用于测定之前于-80℃进行保存。此外,在试验最后一天测定体重之后,在利用二乙醚进行麻醉的情况下进行采血,处死后立即摘出肝,在称量后用干冰冻结,分成两半后分别装入1.5mL的管中,于-80℃进行保存。

[0106] 图1中示出各组的体重增加量在试验期间内的推移。

[0107] 如图1所示,在试验期间内,对照组(C组)中几乎未观察到体重增加。由于本试验例中使用的小鼠为6周龄的生长期的小鼠,因此通常体重会增加,认为由于为肝炎模型小鼠,因此营养代谢异常,体重增加被抑制。与此不同,ARs低摄取组(AL组)及ARs高摄取组(AH组)中,确认到了体重的增加。认为这是由于通过摄取ARs,肝炎得以抑制,其结果营养的代谢异常也得到改善。另一方面,已知对肝等器官中的脂肪蓄积具有抑制效果的白藜芦醇的摄取组(R组)中,未能改善肝炎模型小鼠的体重的增加抑制。认为这是由于,ARs所带来的作用效果并非单纯地是作为通常的脂肪代谢改善的结果的作用效果,而是对肝炎症状特有的作用效果。

[0108] 另一方面,图2中示出各组的饲料摄入量在试验期间内的推移。如图2所示,任意组中均未观察到摄食量有大的差异。

[0109] <试验例3> ~ 血浆中的AST值及ALT值的测定 ~

[0110] 测定作为肝功能的一般性指标的血浆中的天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 值与丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 值。测定使用Transaminase CII-Test Wako (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制造), 并按照FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation的说明书实施。

[0111] 图3中示出各组的AST值在试验期间内的推移。

[0112] 如图3所示, 在对照组 (C组) 中, AST值在第0周至第4周增加, 确认到了肝炎的发展。与此不同, 在ARs低摄取组 (AL组) 及ARs高摄取组 (AH组) 中, AST值的增加均得以抑制。高摄取组的抑制程度比低摄取组显著。另一方面, 白藜芦醇的摄取组 (R组) 中, 几乎以与对照组 (C组) 相同程度的水准推移。

[0113] 图4中示出各组的ALT值在试验期间内的推移。

[0114] 如图4所示, 在对照组 (C组) 中, ALT值在第0周至第4周增加, 确认到了肝炎的发展。与此不同, 在ARs低摄取组 (AL组) 及ARs高摄取组 (AH组) 中, ALT值的增加均得以抑制。高摄取组 (AH组) 的抑制程度比低摄取组 (AL组) 显著。另一方面, 白藜芦醇的摄取组 (R组) 中, 几乎以与对照组 (C组) 相同程度的水准推移。

[0115] 如以上的图3及图4的结果所示, 可知ARs具有抑制肝炎的效果, 且该效果依赖于摄取量。ARs的作用效果为已知通常抑制肝等脏器中的脂肪蓄积的白藜芦醇无法发挥的、对肝炎症状特有的作用效果。

[0116] <试验例4> ~ 肝组织中的中性脂肪量的测定 ~

[0117] 将50mg的冰冻肝组织装入管中, 向其中添加1mL的以2:1的液量比例分别包含氯仿与甲醇的混合液。使用均化器粉碎成糊状, 使用摇床 (shaker) 于室温搅拌总混合物15 ~ 20分钟。将匀浆以15000rpm离心分离5分钟, 回收上清。向回收的上清中添加0.5mL生理盐水, 混合数秒。将混合物以2000rpm离心分离1分钟, 并重复两次去除上部相的操作。对下部氯仿相进行减压干燥, 各用100 μ L的乙醇来使干固物混悬, 并向乙醇中各添加45 μ L的混悬液, 进行混合。将其作为样品, 测定中性脂肪量。

[0118] 测定使用Triglyceride E-Test Wako (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制造), 并按照FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation的说明书实施。将结果示于图5。

[0119] 如图5所示, 在对照组 (C组) 中, 中性脂肪量显示为130mg/g, 是明确的脂肪肝的数值。与此不同, 在ARs低摄取组 (AL组) 及ARs高摄取组 (AH组) 中, 中性脂肪量均减半为60mg/g以下。这些数值在正常的中性脂肪量的范围内。另一方面, 在已知具有抑制肝等器官中的脂肪蓄积的效果的白藜芦醇的摄取组 (R组) 中, 肝炎模型小鼠的肝组织中的中性脂肪量无法矫正。因此, 认为摄取烷基间苯二酚所带来的作用效果并非单纯地是作为通常的脂肪代谢改善的结果的作用效果, 而是对肝炎症状特有的作用效果。

[0120] <试验例5> ~ 肝组织的病理评价 ~

[0121] 用石蜡包埋冰冻肝组织并进行切片。对于所制作的切片, 利用常规方法进行苏木精-伊红 (HE) 染色。将各组的肝组织的HE染色的结果示于图6。

[0122] 如图6所示, 在对照组 (C组) 的肝组织中, 确认到源自脂肪滴的空泡, 其大小、数量均较多, 显示出明确的脂肪肝影像。与此不同, 在ARs低摄取组 (AL组) 及ARs高摄取组 (AH组)

中,空泡的数量及大小均得以抑制。另一方面,白藜芦醇的摄取组(R组)中几乎未观察到效果。因此,与试验例4的结果相同,认为通过摄取烷基间苯二酚,肝组织中的中性脂肪量得以矫正的作用效果并非单纯地是作为通常的脂肪代谢改善的结果的作用效果,而是对肝炎症状特有的作用效果。

[0123] <试验例6> ~ 肝组织中的PPAR γ 基因表达量的测定 ~

[0124] 已知过氧化物酶体增植物激活受体 γ (Peroxisome Proliferators-Activated Receptor γ) (PPAR γ) 是属于核受体超级家族的蛋白质,在脂质代谢中显示重要的作用。作为该PPAR γ 的配体的吡格列酮(被用作糖尿病药)作为非酒精性肝炎治疗药也是有效的。据此,认为增强PPAR γ 的功能为非酒精性肝炎治疗药的有用的靶标。因此,在本试验例中,调查了肝组织中的PPAR γ 基因的表达式。具体而言,以如下所述的方式通过定量PCR进行测定。

[0125] 来自肝组织的总RNA的制备使用“NucleoSpin(注册商标)RNA II Kit(Takara Bio Inc.制造)”,并按照Takara Bio Inc.的说明书实施。来自总RNA的cDNA合成使用“Protoscript(注册商标)II First strand cDNA Synthesis Kit(NEW ENGLAND BioLabs Ltd制造)”,并按照NEW ENGLAND BioLabs Ltd的说明书实施。

[0126] 使用所制作的cDNA的定量PCR中,使用“MyGo Mini Real Time PCR装置(Funakoshi Co.,Ltd.制造)”,使用Luna universal LPCR Mix(NEW ENGLAND BioLabs Ltd制造),并按照NEW ENGLAND BioLabs Ltd的说明书实施。引物使用下述序列。

[0127] (PPAR γ 用)

[0128] 正向:5' -TGTCGGTTTCAGAAGTGCCTTG-3' (SEQ ID NO:1)

[0129] 反向:5' -TTCAGCTGGTCGATATCACTGGAG-3' (SEQ ID NO:2)

[0130] (β -肌动蛋白用)

[0131] 正向:5' -TGACAGGATGCAGAAGGAGA-3' (SEQ ID NO:3)

[0132] 反向:5' -GCTGGAAGGTGGACAGTGAG-3' (SEQ ID NO:4)

[0133] PCR反应在下述条件下实施。

[0134] (95°C30秒→95°C5秒→60°C30秒) × 40个循环→95°C60秒

[0135] 对于肝组织中的过氧化物酶体增植物激活受体 γ (PPAR γ) 基因表达式,比较将对照组(C组)设为100%时的各组的相对值。将结果示于图7。

[0136] 如图7所示,与对照组(C组)相比,在ARs高摄取组(AH)的肝组织中,PPAR γ 基因表达式增加了3.5倍左右。因此,暗示了烷基间苯二酚所带来的肝功能改善效果与增强对PPAR γ 基因的表达式的作用效果相关。

[0137] <试验例7> ~ 肝组织中的各种基因表达量的测定 ~

[0138] 针对已知在脂质代谢中显示重要作用的过氧化物酶体增植物激活受体 γ 辅激活因子1 α (Peroxisome Proliferators-Activated Receptor γ Coactivator-1 α) (PGC-1 α)、过氧化物酶体增植物激活受体 α (Peroxisome Proliferators-Activated Receptor PPAR α)、脂联素 (Adiponectin) 的各种基因,调查了其在肝组织中的基因表达式。测定以与试验例6相同的方式通过定量PCR进行。作为用于该测定的引物,使用下述序列。

[0139] (PGC-1 α 用)

[0140] 正向:5' -AAGTGTGGAAGTCTCTGGAAGT-3' (SEQ ID NO:5)

[0141] 反向:5'-GGGTTATCTTGGTTGGCTTTATG-3' (SEQ ID NO:6)

[0142] (PPAR α 用)

[0143] 正向:5'-AAGTGCCTGTCTGTCTGGGATG-3' (SEQ ID NO:7)

[0144] 反向:5'-CCAGAGATTTGAGGTCTGCAGTTTC-3' (SEQ ID NO:8)

[0145] (脂联素用)

[0146] 正向:5'-GTCAGTGGATCTGACGACACCAA-3' (SEQ ID NO:9)

[0147] 反向:5'-ATGCCTGCCATCCAACCTG-3' (SEQ ID NO:10)

[0148] (β -肌动蛋白用)

[0149] 正向:5'-TGACAGGATGCAGAAGGAGA-3' (SEQ ID NO:3)

[0150] 反向:5'-GCTGGAAGGTGGACAGTGAG-3' (SEQ ID NO:4)

[0151] PCR反应在下述条件下实施。

[0152] (95°C30秒→95°C5秒→60°C30秒)×40个循环→95°C60秒

[0153] 对于肝组织中的基因表达量,比较将对照组(C组)设为100%时的各组的相对值。将结果示于图8A~图8C。

[0154] 如图8A~图8C所示,PGC-1 α 、PPAR α 、脂联素的各基因的肝组织中的表达量在ARs摄取组中显著增加。尤其是PGC-1 α 或脂联素的基因表达量,即使与阳性对照的白藜芦醇的摄取组(R组)相比其也有更进一步的增加(图8A、8C)。因此,暗示了烷基间苯二酚所带来的肝功能改善效果与增强对这些基因的表达的作用效果相关。

[0155] <试验例8>~肝组织的细胞内线粒体数的评价~

[0156] 关于在试验例7中确认到了在烷基间苯二酚摄取组中基因表达量有所增加的PGC-1 α ,已知其基因表达增强会带来线粒体数的上升、氧化磷酸化的促进、TCA循环的活化、基于 β 氧化的脂质燃烧促进、糖原异生、酮体合成促进等。

[0157] 本试验例中,对肝组织的细胞内线粒体数进行调查。具体而言,比较通过以下述方式进行的定量PCR测定的、线粒体DNA量相对于基因组DNA量的量比,由此对肝组织的细胞内线粒体数进行评价。

[0158] 从肝组织提取DNA时,使用“NucleoSpin(注册商标)Tissue kit(Takara Bio Inc.制造)”,并按照Takara Bio Inc.的说明书实施。各DNA拷贝数的定量使用“Mouse Feeder Cell Quantification Kit(Takara Bio Inc.制造)”,并按照Takara Bio Inc.的说明书实施。引物使用下述序列。

[0159] (线粒体DNA用)

[0160] 正向:5'-AACCCGCTCTACCTCACC-3' (SEQ ID NO:11)

[0161] 反向:5'-GTAGCCCATTTCTTCCCATT-3' (SEQ ID NO:12)

[0162] (基因组DNA用)

[0163] 正向:5'-CGCGGTTCTATTTGTTGGT-3' (SEQ ID NO:13)

[0164] 反向:5'-AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3' (SEQ ID NO:14)

[0165] PCR反应在下述条件下实施。

[0166] (95°C30秒→95°C5秒→60°C30秒)×40个循环→95°C60秒

[0167] 对于所测定的线粒体DNA量相对于基因组DNA量的量比,对将对照组(C组)设为100%时的各组的相对值进行比较。将结果示于图9。

[0168] 如图9所示,与对照组(C组)相比,白藜芦醇的摄取组(R组)中未观察到细胞内线粒体数发生变化。与此不同,在ARs低摄取组(AL组)及ARs高摄取组(AH组)中,细胞内线粒体数增加。因此,暗示了烷基间苯二酚摄取所带来的肝功能改善效果与增加肝组织细胞内的线粒体数的作用效果相关。

[0001] <110> 日东富士制粉株式会社
[0002] <120> 肝功能改善用组合物
[0003] <130> 200626WOP
[0004] <160> 14
[0005] <170> PatentIn version 3.5
[0006] <210> 1
[0007] <211> 22
[0008] <212> DNA
[0009] <213> 小鼠
[0010] <220>
[0011] <221> PPAR γ 5'-引物
[0012] <222> (1) .. (22)
[0013] <400> 1
[0014] tgtcggtttc agaagtcct tg 22
[0015] <210> 2
[0016] <211> 24
[0017] <212> DNA
[0018] <213> 小鼠
[0019] <220>
[0020] <221> PPAR γ 3'-引物
[0021] <222> (1) .. (24)
[0022] <400> 2
[0023] ttcagctggt cgatatcact ggag 24
[0024] <210> 3
[0025] <211> 20
[0026] <212> DNA
[0027] <213> 小鼠
[0028] <220>
[0029] <221> 肌动蛋白 5'-引物
[0030] <222> (1) .. (20)
[0031] <400> 3
[0032] tgacaggatg cagaaggaga 20
[0033] <210> 4
[0034] <211> 20
[0035] <212> DNA
[0036] <213> 小鼠
[0037] <220>
[0038] <221> 肌动蛋白 3'-引物

[0039]	<222> (1) .. (20)
[0040]	<400> 4
[0041]	gctggaaggt ggacagtgag 20
[0042]	<210> 5
[0043]	<211> 23
[0044]	<212> DNA
[0045]	<213> 小鼠
[0046]	<220>
[0047]	<221> PGC1 α 5'-引物
[0048]	<222> (1) .. (23)
[0049]	<400> 5
[0050]	aagtgtggaa ctctctggaa ctg 23
[0051]	<210> 6
[0052]	<211> 23
[0053]	<212> DNA
[0054]	<213> 小鼠
[0055]	<220>
[0056]	<221> PGC1 α 3'-引物
[0057]	<222> (1) .. (23)
[0058]	<400> 6
[0059]	gggttatctt ggttggttt atg 23
[0060]	<210> 7
[0061]	<211> 21
[0062]	<212> DNA
[0063]	<213> 小鼠
[0064]	<220>
[0065]	<221> PPAR α 5'-引物
[0066]	<222> (1) .. (21)
[0067]	<400> 7
[0068]	aagtgcctgt ctgtcgggat g 21
[0069]	<210> 8
[0070]	<211> 25
[0071]	<212> DNA
[0072]	<213> 小鼠
[0073]	<220>
[0074]	<221> PPAR α 3'-引物
[0075]	<222> (1) .. (25)
[0076]	<400> 8
[0077]	ccagagattt gaggtctgca gtttc 25

[0078]	<210> 9
[0079]	<211> 23
[0080]	<212> DNA
[0081]	<213> 小鼠
[0082]	<220>
[0083]	<221> 脂联素 5'-引物
[0084]	<222> (1) .. (23)
[0085]	<400> 9
[0086]	gtcagtggat ctgacgacac caa 23
[0087]	<210> 10
[0088]	<211> 19
[0089]	<212> DNA
[0090]	<213> 小鼠
[0091]	<220>
[0092]	<221> 脂联素 3'-引物
[0093]	<222> (1) .. (19)
[0094]	<400> 10
[0095]	atgcctgcca tccaacctg 19
[0096]	<210> 11
[0097]	<211> 19
[0098]	<212> DNA
[0099]	<213> 小鼠
[0100]	<220>
[0101]	<221> mtDNA 5'-引物
[0102]	<222> (1) .. (19)
[0103]	<400> 11
[0104]	aaccccgctc tacctcacc 19
[0105]	<210> 12
[0106]	<211> 21
[0107]	<212> DNA
[0108]	<213> 小鼠
[0109]	<220>
[0110]	<221> mtDNA 3'-引物
[0111]	<222> (1) .. (21)
[0112]	<400> 12
[0113]	gtagccatt tcttccatt t 21
[0114]	<210> 13
[0115]	<211> 20
[0116]	<212> DNA

[0117] <213> 小鼠
[0118] <220>
[0119] <221> 基因组DNA 5'-引物
[0120] <222> (1) .. (20)
[0121] <400> 13
[0122] cgcggttcta ttttggttggt 20
[0123] <210> 14
[0124] <211> 20
[0125] <212> DNA
[0126] <213> 小鼠
[0127] <220>
[0128] <221> 基因组DNA 3'-引物
[0129] <222> (1) .. (20)
[0130] <400> 14
[0131] agtcggcatc gtttatggtc 20

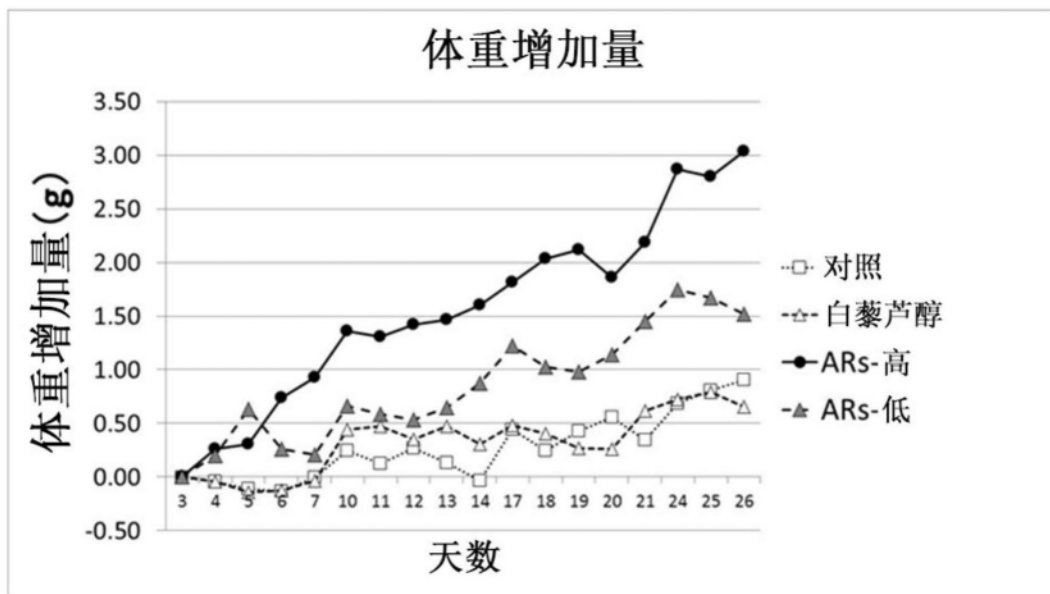


图1

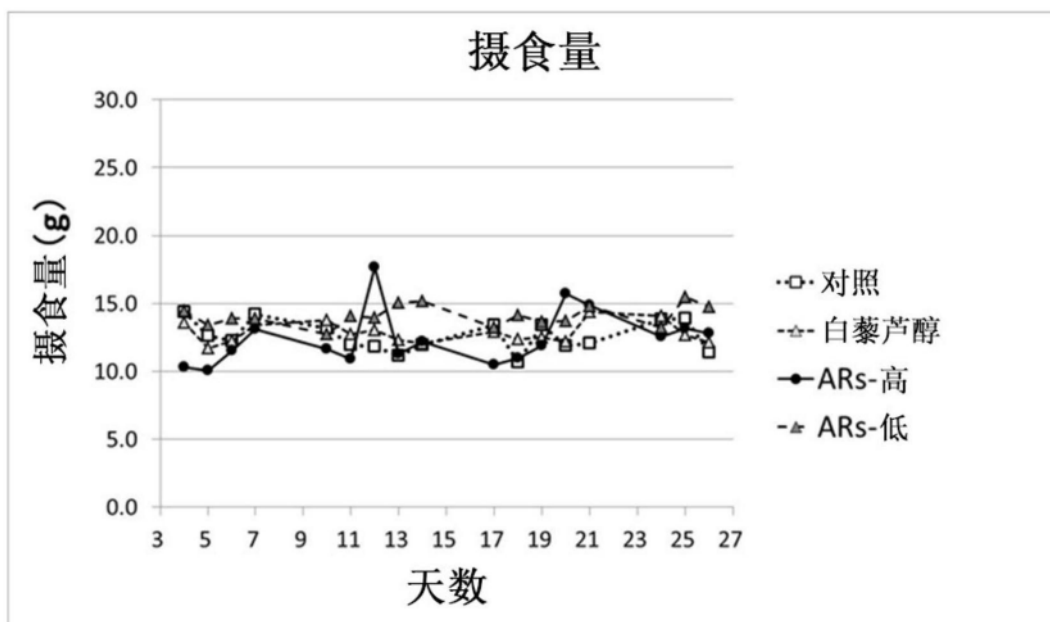


图2

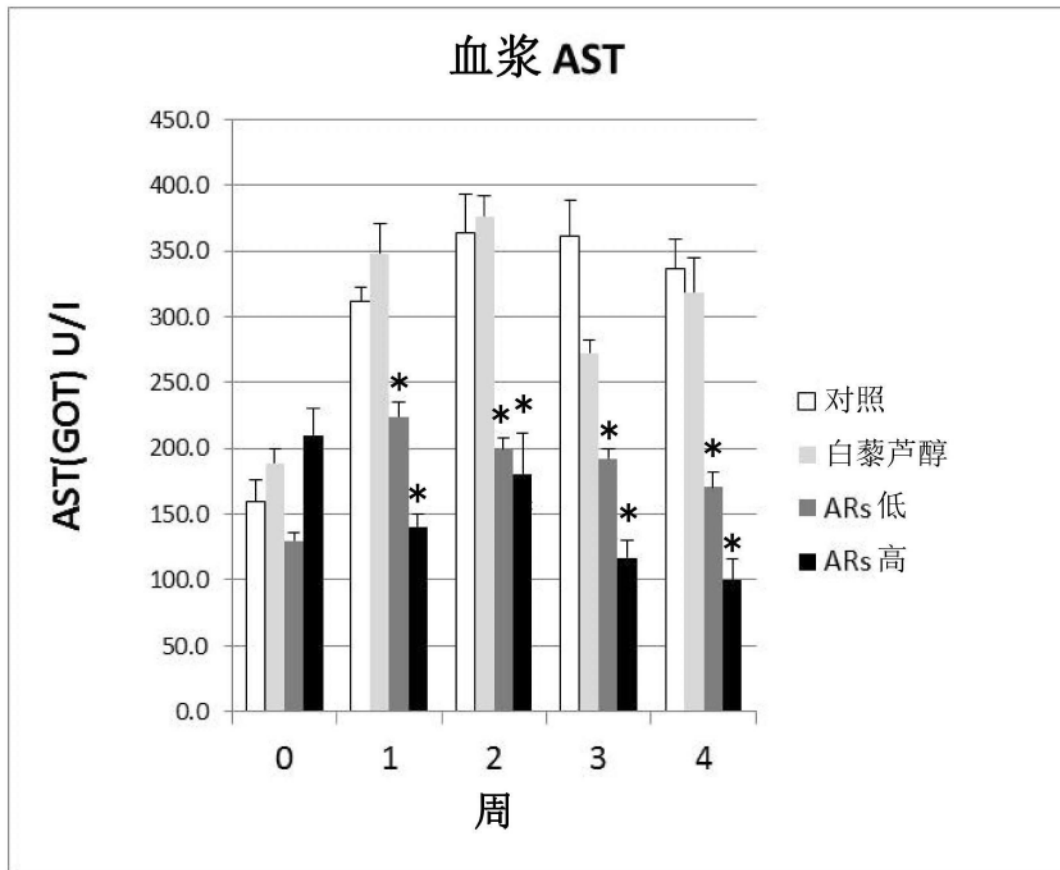


图3

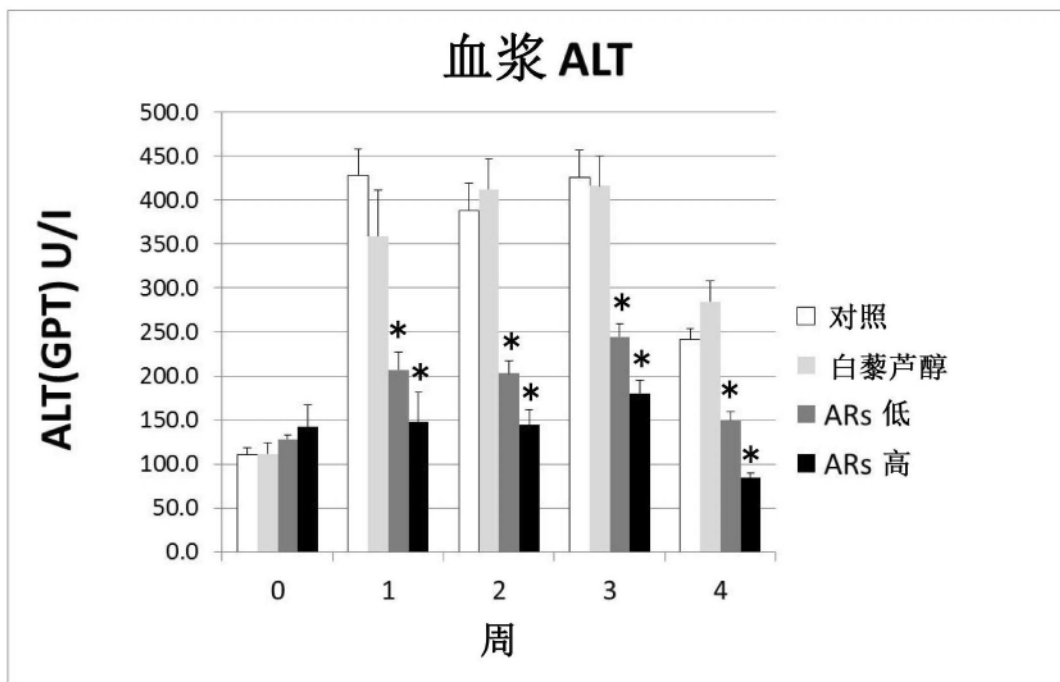


图4

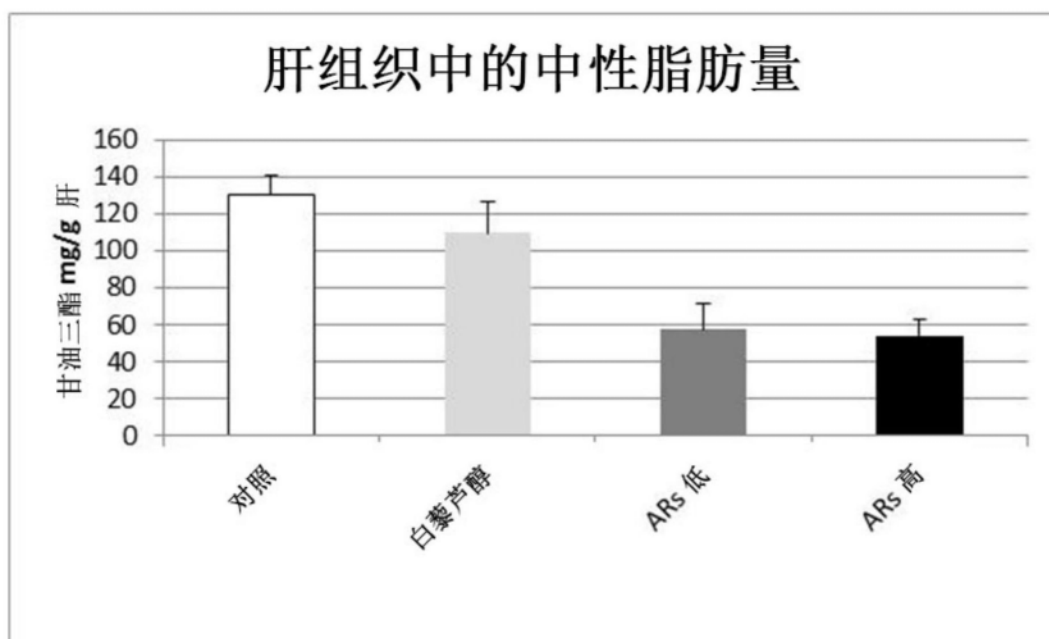


图5

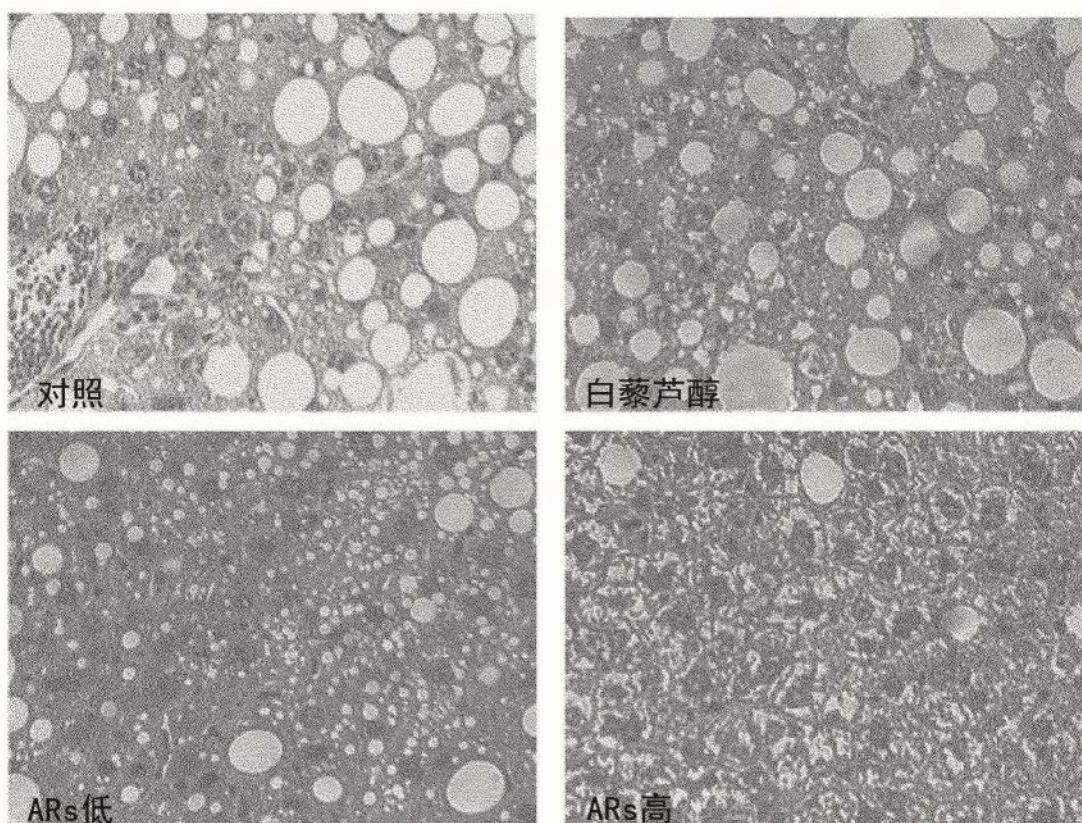


图6

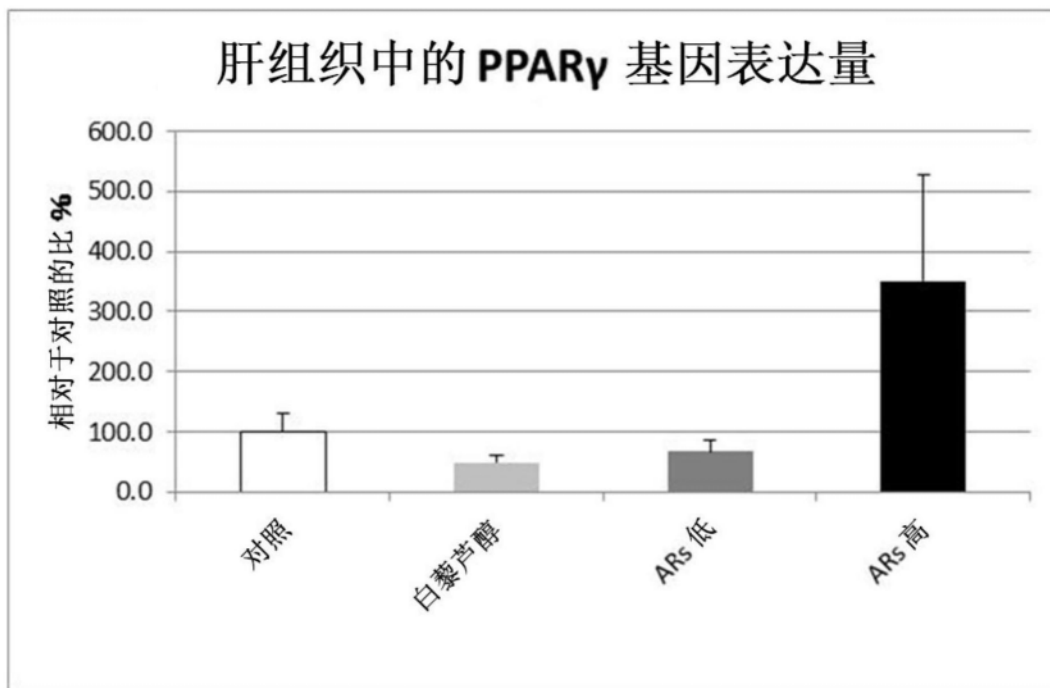


图7

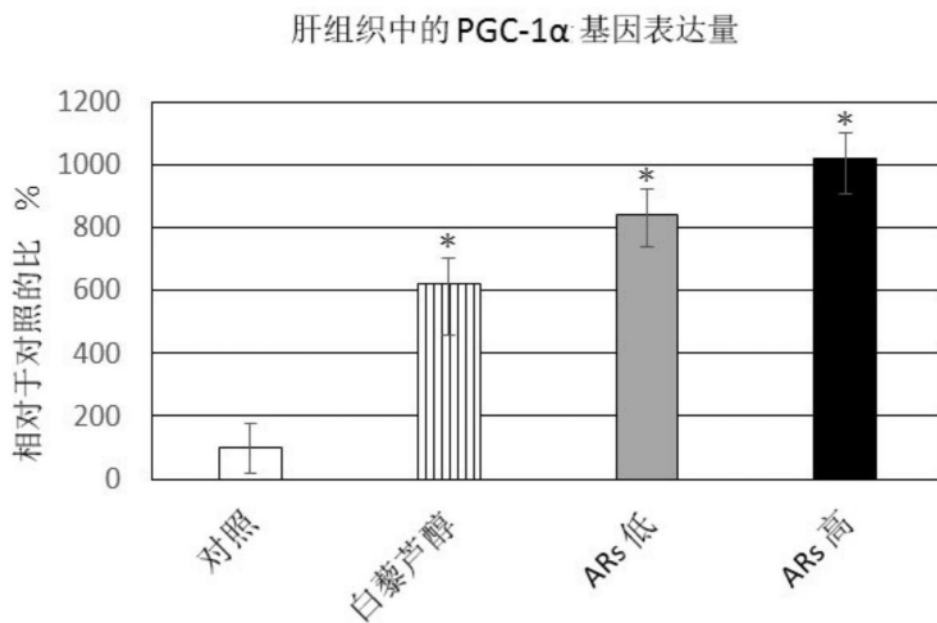


图8A

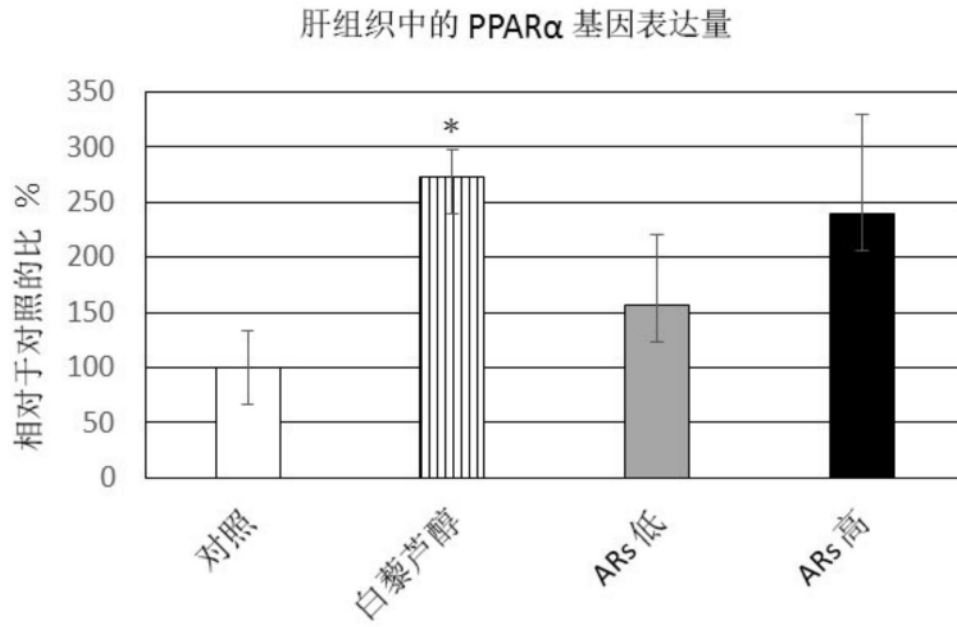


图8B

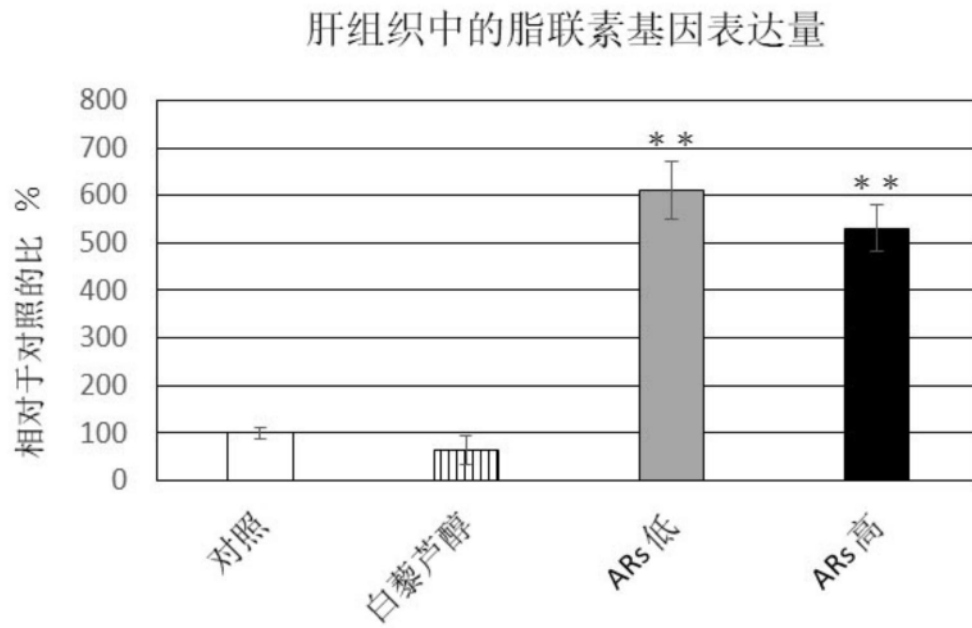


图8C

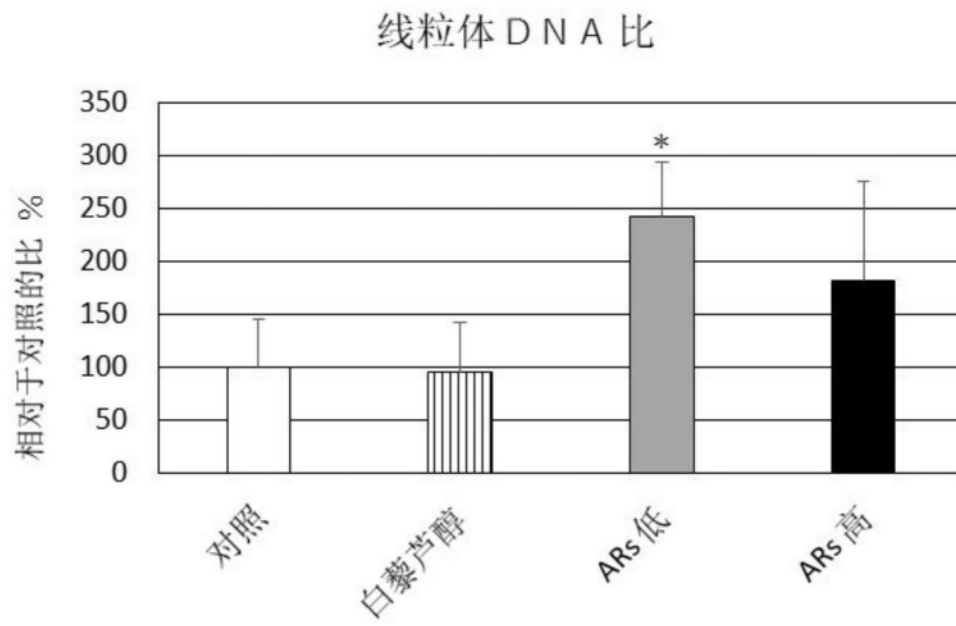


图9