

(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
2015 年 4 月 2 日(02.04.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/045265 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 36/02 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) A61P 31/20 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/004305
- (22) 国際出願日: 2014 年 8 月 21 日(21.08.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-197102 2013 年 9 月 24 日(24.09.2013) JP
- (71) 出願人: 株式会社デンソー(DENSO CORPORATION) [JP/JP]; 〒4488661 愛知県刈谷市昭和町 1 丁目 1 番地 Aichi (JP). 学校法人中部大学(CHUBU UNIVERSITY EDUCATIONAL FOUNDATION) [JP/JP]; 〒4878501 愛知県春日井市松本町 1 2 0 O Aichi (JP).
- (72) 発明者: 栗山 裕樹(KURIYAMA, Hiroki); 〒4488661 愛知県刈谷市昭和町 1 丁目 1 番地株式会社デンソー内 Aichi (JP). 渥美 欣也(ATSUMI, Kinya); 〒4488661 愛知県刈谷市昭和町 1 丁目 1 番地株式会社デンソー内 Aichi (JP). 福田 裕章(FUKUDA, Hiroaki); 〒4488661 愛知県刈谷市昭和

町 1 丁目 1 番地株式会社デンソー内 Aichi (JP). 林 京子(HAYASHI, Kyoko); 〒4878501 愛知県春日井市松本町 1 2 0 0 学校法人中部大学内 Aichi (JP).

(74) 代理人: 金 順姫(KIN, Junhi); 〒4600003 愛知県名古屋市中区錦 2 丁目 1 3 番 1 9 号 瀧定ビル 6 階 Aichi (JP).

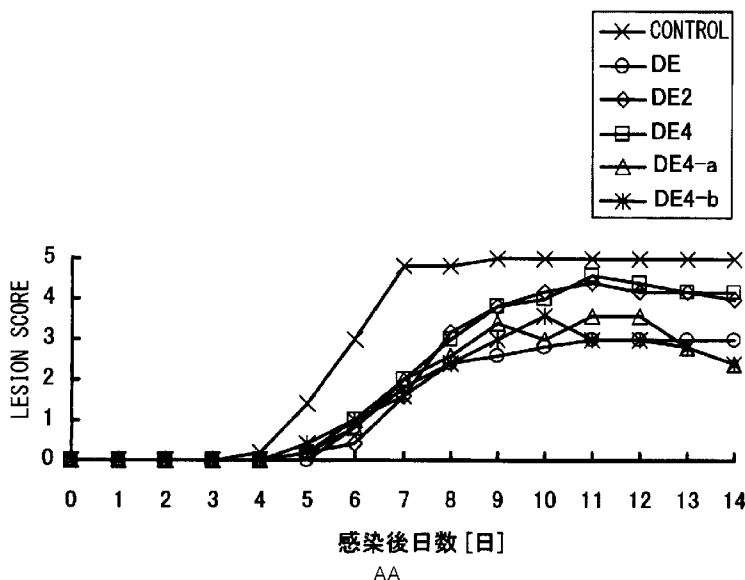
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG,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

[続葉有]

(54) Title: ANTIVIRAL AGENT

(54) 発明の名称: 抗ウイルス剤



AA Days after infection [Days]

(57) Abstract: This antiviral agent comprises, as an active ingredient, an extract derived from a microalga *Pseudochoricystis ellipsoidea* Sekiguchi et Kurano gen. et sp. nov. MBIC11204 strain. The microalga may be cultured in a culture medium comprising sufficient nitrogen or may be cultured in a nitrogen-deficient medium thereafter. The extract is extracted from the microalga with alcohol, hot water, etc. as an extractant. The extract may be extracted from the residue thereof with hot water. The antiviral agent may comprise the extract obtained using one extractant or may comprise a mixture of each of the extracts obtained using multiple extractants.

(57) 要約: 本開示に係る抗ウイルス剤は、微細藻類シュードコリスチス エリプソイディア セキグチ エト クラノ ジェンエト エスピー ノブ MBIC11204 株から抽出された抽出物を有効成分として含有する。微細藻類は、窒素を十分に含む培地で培養してもよいし、この後窒素欠乏培地で培養してもよい。抽出物は、微細藻類から、アルコール、熱水等を抽出溶媒として用いた抽出される。その残渣から、熱水を用いて抽出してもよい。抗ウイルス剤は、1つの抽出溶媒における抽出物を含んでもよいし、複数の抽出溶媒における各抽出物の混合物を含んでもよい。

し、複数の抽出溶媒における各抽出物の混合物を含んでもよい。



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 添付公開書類:

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).

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：抗ウイルス剤

関連出願の相互参照

[0001] 本出願は、2013年9月24日に提出された日本国特許出願2013-197102号に基づくものであり、ここにその記載内容を参照により援用する。

技術分野

[0002] 本開示は抗ウイルス剤に関する。

背景技術

[0003] 従来、藻類は、食品、飼料等に利用されている。藻類の利用方法の一つとして、コッコミクサ藻体の抽出物を有効成分とする抗ウイルス剤が開示されている（特許文献1参照）。

[0004] 本願発明者らは、以下を見出した。特許文献1で示されるような藻体は細胞単独に対して抗ウイルス活性があるのみで、様々な感染防御機能も考慮した生体試験で抗ウイルス活性を示す藻体は知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：日本国特許第4411523号公報

発明の概要

[0006] 本開示は以上の点に鑑みなされたものであり、新規な抗ウイルス剤を提供することを目的とする。

[0007] 本開示の一態様に係る抗ウイルス剤は、微細藻類シュードコリスチス エリプソイディア セキグチ エト クラノ ジェンエト エスピー ノブMBIC 11204株抽出物を有効成分として含有する。

[0008] 本開示に係るウイルス剤によれば、様々な感染防御機能も考慮した生体試験で抗ウイルス活性が得られ、新規な抗ウイルス剤が提供される。

図面の簡単な説明

- [0009] 本開示についての上記および他の目的、特徴や利点は、添付の図面を参照した下記の詳細な説明から、より明確になる。添付図面において、
- [図1]図1は、性器ヘルペスの重症度（lesion score）の記録結果を表すグラフであり、
- [図2]図2は、感染3日後における性器内の単純ヘルペスウイルス2型（HSV-2）の量を表すグラフであり、
- [図3]図3は、感染3日後におけるA型インフルエンザウイルス（A/NWS/33株、H1N1亜型）の量を表すグラフであり、
- [図4]図4は、A型インフルエンザウイルス感染後におけるマウス体重の推移を表すグラフであり、
- [図5]図5は、A型インフルエンザウイルス感染14日後におけるマウス血清中の中和抗体価を表すグラフであり、
- [図6]図6は、A型インフルエンザウイルス感染14日後におけるマウス気道洗浄液（BALF）中の中和抗体価を表すグラフであり、
- [図7]図7は、感染3日後におけるA型インフルエンザウイルス（A/NWS/33株、H1N1亜型）の量を表すグラフであり、
- [図8]図8は、A型インフルエンザウイルス感染後におけるマウス体重の推移を表すグラフであり、
- [図9]図9は、A型インフルエンザウイルス感染14日後におけるマウス血清中の中和抗体価を表すグラフであり、
- [図10]図10は、A型インフルエンザウイルス感染14日後におけるマウス気道洗浄液（BALF）中の中和抗体価を表すグラフであり、
- [図11]図11は、A型インフルエンザウイルス感染14日後における糞便抽出物のIgA量を表すグラフであり、
- [図12]図12は、A型インフルエンザウイルス感染14日後におけるマウス気道洗浄液（BALF）中のIgA量を表すグラフであり、
- [図13]図13は、A型インフルエンザウイルス感染後におけるマウス体重の推移を表すグラフであり、

[図14]図14は、感染3日後におけるA型インフルエンザウイルス（A／NWS／33株、H1N1亜型）の量を表すグラフであり、

[図15]図15は、A型インフルエンザウイルス感染14日後におけるマウス血清中の中和抗体価を表すグラフであり、

[図16]図16は、A型インフルエンザウイルス感染14日後におけるマウス気道洗浄液（BALF）中の中和抗体価を表すグラフであり、

[図17]図17は、A型インフルエンザウイルス感染14日後におけるマウス糞便抽出物のIgA量を表すグラフであり、

[図18]図18は、A型インフルエンザウイルス感染14日後におけるマウス気道洗浄液（BALF）のIgA量を表すグラフである。

発明を実施するための形態

[0010] 本開示の実施形態を説明する。本開示で用いる微細藻類シュードコリシスチス エリプソイディア セキグチ エト クラノ ジェン エト エスピー ノブ（*Pseudochoricystis ellipsoidea* Sekiguchi et Kurano gen. et sp. nov.）MBIC11204株は、2005年2月15日付で独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（IPOD）（茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に受託番号FERM P-20401として寄託され、2006年1月18日付でプタベスト条約の規定下で受託番号FERMBP-10484として国際寄託に移管されている。

[0011] MBIC11204株は、窒素を充分に含む培地で培養してもよいし、この後窒素欠乏培地で培養してもよい。抽出物（微細藻類抽出物とも呼ぶ）は、例えば、MBIC11204株から、アルコール(例えばエタノール)、熱水等を抽出溶媒として用いた抽出により得ることができる。抽出は、例えば、複数種類の抽出媒体を用いて順次行うことができる。例えば、MBIC11204株から、アルコールを用いて抽出を行い、その残渣から、熱水を用いて抽出を行うことができる。抗ウイルス剤は、例えば、1つの抽出溶媒における抽出物を含んでいてもよいし、複数の抽出溶媒における各抽出物の混合物を含んでいてもよい。

[0012] 抽出を行う際、例えば、MBIC11204株を乾燥（例えば凍結乾燥）させた乾燥藻体を作成し、その乾燥藻体から抽出を行うことができる。

[0013] 抽出物は、例えば、カラムクロマトグラフィー等の方法で分画することができる。抗ウイルス剤は、抽出物全体を含むものであってもよいし、一部の画分（例えば、抗ウイルス活性が特に高い画分）を含むものであってもよい。

[0014] 抗ウイルス剤の剤型は特に限定されず、例えば、液状、粉末状、固形状等とすることができる。抗ウイルス剤における抽出物の濃度は特に限定されず、容量、用途、用法等に応じて適宜設定することができる。抗ウイルス剤は、適宜、抽出物以外の各種成分を含んでいてもよい。

<実施例>

（１）N充分の培地での微細藻類の培養

脱塩水を用いて下記表１に示す組成の培地を500mL作り、これを扁平なガラスフラスコ（稼働容量500mL）に入れ加圧滅菌した。

[表1]

培地組成

NaNO ₃	150mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10mg
KH ₂ PO ₄	3. 5mg
K ₂ HP04	4. 5mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0. 9mg
Fe-EDTA	1. 2mL
金属溶液 (*)	0. 1mL
脱塩水	99. 8mL
pH	7. 5

(*) 金属溶液

H ₃ BO ₃	7mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	15mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	30mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	30mg
Na ₂ MoO ₄	0. 3mg
CoCl ₂	7mg
脱塩水	100mL

この培地にMBIC11204株を植菌し、フラスコに通気性のある栓をした。フラスコ内に3%のCO₂を付加した空気を通気すると同時に、フラスコ内の培養液を攪拌した。このとき、フラスコの周囲から白色蛍光ランプにより光を照射した。また、フラスコを恒温水槽に浸けて内部の温度を28℃(セルシウス度)付近に調節した。

[0015] 藻体の乾燥重量をMBIC11204株の生育の指標として経時的に測定

した。対数増殖期の比増殖速度は 0.079 h^{-1} であり、8.8時間に1回細胞分裂した。藻体が充分増殖したとき、上記培養液のうち300 mLを回収し、その300 mLから藻体を遠心分離した。その後、藻体を凍結乾燥し、520.4 mgの乾燥藻体S1を得た。

(2) N欠乏培地で微細藻類の培養

上記(1)と同様に、上記表1に示す組成の培地500 mLでMBIC11204株を培養した。培養液のうち400 mLを回収し、その400 mLから藻体を遠心分離した。遠心分離の条件は、15,000 rpm、10分間とした。

[0016] 次に、遠心分離した藻体を、上記表1に示す組成から NaNO_3 を除いた窒素欠乏培地で2回洗浄し、さらに該窒素欠乏培地を用いて同じ条件で3日間培養した。このことにより、細胞内に炭化水素を蓄積した藻体を含む培養液が得られた。上記培養液のうち300 mLを回収し、回収した300 mLから藻体を遠心分離した。その後、藻体を凍結乾燥し、884.7 mgの乾燥藻体S2を得た。

(3) エタノールを用いた抽出

100 gの乾燥藻体S1に対し、1 Lのエタノールを添加して分散させ、暗所で3日間静置した。静置後、ろ過して、1次ろ液と残渣とに分離した。この残渣に上記と同様に1 Lのエタノールを添加して分散させ、3日間静置した後再度ろ過して2次ろ液と残渣とに分離した。このろ過操作をもう一度繰り返し、3次ろ液と残渣とを得た。

[0017] 1次ろ液、2次ろ液、及び3次ろ液を混合し、エバポレーターでエタノールを留去し、減圧乾燥してエタノール抽出物DEを8.5 g得た。また、乾燥藻体S1の代わりに同量の乾燥藻体S2を用い、上と同様の方法で、エタノール抽出物DE'を8.7 g得た。

[0018] 8.5 gのエタノール抽出物DEをメタノールに懸濁させた後、合成吸着剤(DIAION HP-20 三菱化学(株)製)を充填したカラムに付した。合成吸着剤の量は500 gであり、カラムの内径は3.5 mmであり

、カラムの軸長は60 cmである。

[0019] カラムに対し、第1の展開溶媒（蒸留水）、第2の展開溶媒（メタノールと蒸留水とを体積比1：1で含む溶媒）、第3の展開溶媒（メタノール）、及び第4の展開溶媒（アセトン）を、この順序で、それぞれ、1.5 Lずつ流し、エタノール抽出物DEを分画した。それぞれの画分を室温で減圧乾燥し、分画されたエタノール抽出物を得た。

[0020] 第1の展開溶媒の画分に含まれる成分をエタノール抽出物DE1とした。得られたエタノール抽出物DE1は777.9 mgであった。第2の展開溶媒の画分に含まれる成分をエタノール抽出物DE2とした。得られたエタノール抽出物DE2は139.1 mgであった。第3の展開溶媒の画分に含まれる成分をエタノール抽出物DE3とした。得られたエタノール抽出物DE3は1.78 gであった。第4の展開溶媒の画分に含まれる成分をエタノール抽出物DE4とした。得られたエタノール抽出物DE4は3.26 gであった。

[0021] 2.1 gのエタノール抽出物DE4を、分取クロマトグラフィー用シリカゲル（シリカゲル60、メルク製）を充填したカラムに付した。シリカゲルの充填量は30 gであり、シリカゲルの粒径は0.063–0.200 mmであり、カラムの内径は2 cmであり、カラムの軸長は20 cmである。

[0022] カラムに対し、展開溶媒A～Gをこの順序で流し、エタノール抽出物DE4をさらに分画した。展開溶媒A～Gは、それぞれ、以下のものである。

[0023] 展開溶媒A：n-ヘキサン

展開溶媒B：n-ヘキサンと酢酸エチルとを、体積比5：1で混合した溶媒

展開溶媒C：n-ヘキサンと酢酸エチルとを、体積比3：1で混合した溶媒

展開溶媒D：n-ヘキサンと酢酸エチルとを、体積比1：1で混合した溶媒

展開溶媒E：n-ヘキサンと酢酸エチルとを、体積比1：3で混合した溶媒

媒

展開溶媒F：酢酸エチル

展開溶媒G：酢酸エチルとメタノールとを、体積比1：1で混合した溶媒

展開溶媒Aの画分を室温で減圧乾燥させ、216.3mgの抽出物（以下、エタノール抽出物DE4-aとする）を得た。また、展開溶媒Eの画分を室温で減圧乾燥させ、170.3mgの抽出物（以下、エタノール抽出物DE4-bとする）を得た。

（4）熱水を用いた抽出

上記（3）において乾燥藻体S1からエタノール抽出物DEを抽出した後の残渣に蒸留水1Lを加え、85℃で1h加熱後、ろ過して1次ろ液と残渣とに分離した。さらに、その残渣に1Lの蒸留水を添加して残渣を分散させ、再度85℃で1h加熱後、ろ過して2次ろ液と残渣とに分離した。

[0024] 得られた1次ろ液と2次ろ液とを混合し、室温で減圧濃縮し、凍結乾燥させることにより熱水抽出物DW17.0gを得た。

[0025] 次に、熱水抽出物DWに4Lのエタノールを加えて4℃で一晩静置した。静置後、上清と沈殿とに分離した。上清は室温で減圧濃縮し、凍結乾燥させることにより上清成分DL7.5gを得た。一方、上記沈殿を遠心分離し、得られた沈降をエタノール1Lで洗浄後、蒸留水1Lに溶解させた後に凍結乾燥させ、沈降成分DH8.2gを得た。

[0026] また、上記（3）において乾燥藻体S2からエタノール抽出物DE'を抽出した後の残渣に蒸留水1Lを加え、85℃で1h加熱後、ろ過して1次ろ液と残渣とに分離した。さらに、その残渣に1Lの蒸留水を添加して残渣を分散させ、再度85℃で1h加熱後、ろ過して2次ろ液と残渣とに分離した。得られた1次ろ液と2次ろ液とを混合し、室温で減圧濃縮し、凍結乾燥させることにより熱水抽出物DW'10.5gを得た。

（5）オイル抽出残渣からの熱水を用いた抽出

19.7gの乾燥藻体S2に対し、500mLのn-ヘキサンを添加して乾燥粉体S2を分散させた。その後、室温で1日静置し、オイルを抽出した

。静置後、ろ過してオイルを含むろ液とオイル抽出残渣とに分離した。残渣には上記と同様に500 mLのn-ヘキサンを添加して残渣を分散させ、1日静置した後、再度ろ過してろ液とオイル抽出残渣とに分離した。この操作をもう一度繰り返し、ろ液とオイル抽出残渣とを得た。

[0027] オイル抽出残渣を室温で減圧乾燥した。得られたオイル抽出残渣に蒸留水1 Lを加え、85℃で1 h加熱後、ろ過して1次ろ液と残渣とに分離した。残渣に上記と同様に1 Lの蒸留水を添加して残渣を分散させ、再度85℃で1 h加熱後、ろ過して2次ろ液と残渣とに分離した。得られた1次ろ液と2次ろ液とを混合し、室温で減圧濃縮し、凍結乾燥させることにより、オイル抽出残渣からの熱水抽出物DOを7.0 g得た。

(6) 単純ヘルペスウイルス2型(HSV-2)に対する抗ウイルス剤の効果を確認するための試験

サンプルとしてエタノール抽出物DE、DE2、DE4、DE4-a、DE4-bを用い、以下の方法で、HSV-2に対する効果を試験した。

[0028] BALB/cマウス(♀、5週齢)(n=5)に、HSV-2を接種し、感染させた。HSV-2は1回、局所投与した。1回の投与量は、 1×10^4 PFU/20 μ L/mouseとした。この「 1×10^4 PFU/20 μ L/mouse」とは、 1×10^4 PFUのウイルスを20 μ Lのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に加えたものを、1匹のマウスに投与することを意味する。PFUとは、プラーク形成単位である。

[0029] なお、ウイルス接種の6日前、及び1日前に、それぞれ、medroxyprogesterone 17-acetate (3 mg/0.1 mL/mouse)をマウスに皮下注射しておいた。

[0030] また、ウイルス接種の1時間前から7日後まで、1日2回サンプルを局所投与した。1回のサンプル投与量は、1 mg/20 μ L/mouseとした。この「1 mg/20 μ L/mouse」とは、1 mgのサンプルを20 μ Lの1% DMSO添加PBSに溶解したものを、1匹のマウスに投与することを意味する。

[0031] ウイルス接種の3日後に、マウスの局所をPBSで洗浄し、その中のウイルス量をプラーク法で測定した。ウイルス量については、Control群に対する有意差を、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ で表した。

[0032] また、ウイルス接種の日から、その14日後まで、死亡例や性器ヘルペスの発症の程度 (lesion score) を記録した。lesion scoreの記録結果を図1に示す。図1における「1」～「5」はそれぞれ以下を意味する。

- [0033] 1 : 腫脹あり
2 : 腫脹及び発赤あり
3 : 液滲出あり
4 : 後ろ足麻痺
5 : 死亡

この結果から、エタノール抽出物DE、DE2、DE4、DE4-a、DE4-bは、ヘルペスウイルスの発症程度を抑制することがわかった。また、感染3日後におけるウイルス量を図2に示す。この結果から、エタノール抽出物DEは、ウイルス生産量を有意に低下させることがわかった。

(7) A型インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス剤の効果を確認するための試験

サンプルとしてエタノール抽出物DE、DE'、熱水抽出物DW、DW'、DO、上清成分DL、沈降成分DHを用い、以下の方法で、A型インフルエンザウイルスに対する効果を試験した。

(7-1) 体重、ウイルス量、及び中和抗体価の測定

BALB/cマウス(♀、6週齢)($n = 10$)に、A型インフルエンザウイルス(A/NWS/33株、H1N1亜型)を経鼻接種し、感染させた。ウイルスの接種量は、 $1 \times 10^4 \text{ PFU} / 50 \mu\text{L} / \text{mouse}$ とした。この「 $1 \times 10^4 \text{ PFU} / 50 \mu\text{L} / \text{mouse}$ 」とは、 $1 \times 10^4 \text{ PFU}$ のウイルスを $50 \mu\text{L}$ のPBSに加えたものを、1匹のマウスに投与することを

意味する。

- [0034] ウイルス接種の日の1週間前から、1週間後までの2週間にわたって、サンプルを1日2回（9時および18時）、マウスに経口投与した。投与量は、5mg/dayとした。
- [0035] ウイルス接種の日から、2週間にわたって、マウスの体重及び死亡数を記録した。サンプルとしてエタノール抽出物DE、DW、DL、DHを投与した群では死亡例はなかった。一方、Control群では、感染6日後に1匹が死亡した。
- [0036] マウス体重の推移を図4、図8、図13に示す。図4に示すように、サンプルとしてエタノール抽出物DE、熱水抽出物DWを投与した群は、感染7日後まではControl群と同程度の体重減少を示したが、8日後からの体重の回復はControl群よりも早かった。特に、エタノール抽出物DEを投与した群の回復は一層早かった。
- [0037] また、図8に示すように、サンプルとしてエタノール抽出物DE、熱水抽出物DW、DW'、DOを投与した群は、Control群に比べ、感染7日後までの体重減少が少なく、その後の回復が早かった。また、サンプルとしてエタノール抽出物DE'を投与した群は、Control群に比べ、感染10日後までの体重変化は同程度であったが、その後の回復は早かった。
- [0038] また、図13に示すように、サンプルとしてエタノール抽出物DE、上清成分DL、沈降成分DHを投与した群は、Control群に比べ、体重減少が少なかった。
- [0039] また、ウイルス接種の日から3日後に、半数（5匹）のマウスから、気道洗浄液（BALF）及び肺を採取した。BALFは、0.8mLの氷冷したPBSをカテーテルから気道に入れ、気道を洗浄して得た液である。BALFを採取した後に、肺を摘出した。肺及びBALFのそれぞれについて、それらに含まれるウイルス量を測定した。感染3日後におけるウイルス量を図3、図7、図14に示す。
- [0040] 図3に示すように、サンプルとしてエタノール抽出物DE、熱水抽出物D

Wを投与した群は、Control群に比べ、ウイルス増殖を抑制していた。特に、DWを投与した群は、ウイルス増殖を顕著に抑制していた。

[0041] また、図7に示すように、サンプルとしてエタノール抽出物DE、DE'、熱水抽出物DW、DW'、DOを投与した群は、Control群に比べ、ウイルス増殖を抑制していた。

[0042] また、図14に示すように、サンプルとしてエタノール抽出物DE、上清成分DL、沈降成分DHを投与した群は、Control群に比べ、ウイルス増殖を抑制していた。

[0043] また、ウイルス接種の日から14日後に、残り半数のマウスから、血液、BALF、及び糞便を採取した。そして、この血液及びBALFを用いて、以下に示すとおり、中和抗体価を測定した。

[0044] 血液から血清を遠心分離し、非働化した。このとき、遠心分離の条件は、3,000rpm、4℃とし、非働化の条件は56℃、30分間とした。一方、BALFは、採取後すぐに-80℃で保存した。

[0045] 血清をPBSで適宜希釈した液（以下、血清希釈液とする）と、BALFをPBSで適宜希釈した液（以下、BALF希釈液とする）とをそれぞれ作成した。

[0046] 血清希釈液100μlと、ウイルス液（A型インフルエンザウイルスを2、000PFU/mLの濃度で含む液）100μlとを、96-well platesに加えて混合した。以下では、この混合液を、血清-ウイルス混合液とする。血清-ウイルス混合液は、体積が200μlであり、その中に200PFUのA型インフルエンザウイルスを含む。

[0047] また、BALF希釈液100μlと、ウイルス液100μlとを、96-well platesに加えて混合した。以下では、この混合液を、BALF-ウイルス混合液とする。BALF-ウイルス混合液は、体積が200μlであり、その中に200PFUのA型インフルエンザウイルスを含む。

[0048] また、controlとして、PBS100μlと、ウイルス液100μlとを、96-well platesに加えて混合した。以下では、この

混合液を、control液とする。control液は、体積が200 μ Lであり、その中に200PFUのA型インフルエンザウイルスを含む。

[0049] 血清－ウイルス混合液、BALF－ウイルス混合液、及びcontrol液を、それぞれ、37℃で1時間処理してから、35-mm dishesに単層状に培養したMDCK細胞へ、100 μ L/dishの量で加えて、室温で感染させた。1時間後に、寒天培地（2mL/dish）を重層し、37℃で2日間培養した。培地を除去後、クリスタルバイオレット液で固定・染色し、プラーク数を測定した。血清－ウイルス混合液、及びBALF－ウイルス混合液におけるプラーク数を計算し、Control液におけるプラーク数を100%とした時の50%阻害希釈倍数を求め、それを中和抗体価とした。

[0050] 感染14日後における血清－ウイルス混合液の中和抗体価を図5、図9、図15に示す。また、感染14日後におけるBALF－ウイルス混合液の中和抗体価を図6、図10、図16に示す。

[0051] 図5、図6に示すように、サンプルとしてエタノール抽出物DE、熱水抽出物DWを投与した群では、Control群、及びオセルタミビル（F. ホフマン・ラ・ロシュ製）を投与した群に比べて、中和抗体価が高かった。

[0052] また、図9、図10に示すように、サンプルとしてエタノール抽出物DE、DE'、熱水抽出物DW、DW'、DOを投与した群では、Control群、及びオセルタミビルを投与した群に比べて、中和抗体価が高かった。

[0053] また、図15、図16に示すように、サンプルとしてエタノール抽出物DE、上清成分DL、沈降成分DHを投与した群では、Control群、及びオセルタミビルを投与した群に比べて、中和抗体価が高かった。

[0054] なお、上記のように、中和抗体価が高くなる原因としては、エタノール抽出物DE、DE'、熱水抽出物DW、DW'、DO、上清成分DL、沈降成分DHが免疫系刺激効果を有するためであると推定される。

（7－2）IgAの測定

ウイルス接種の日から14日後に採取した糞便に、10倍量のPBSを加

え、室温で15分間放置した後、ボルテックスミキサーで処理した。その後さらに15分間放置してから、遠心分離（3,000rpm、10分間）により上清を得た。以下では、この上澄みを糞便抽出物とする。一方、ウイルス接種の日から14日後に採取したBALFをPBSで5倍希釈した。以下では、この希釈液を5倍希釈BALFとする。

[0055] 次に、以下の手順でELISAを実施し、IgAを測定した。

[0056] a) 抗原（精製したウイルス、1μg/mL of PBS）を、ELISA用96-well plates（MaxiSorp、Nunc製）に50μL/wellずつ加え、37℃で1時間処理した。

[0057] b) PBS-T液でwellを3回洗浄した。ここで、PBS-T液とは、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート（製品名Tween-20）を、0.5%の濃度で含むPBS溶液である。

[0058] c) 5%スキムミルク（PBSに溶解したもの）を100μL/well加え、4℃で一晩ブロッキング処理した。

[0059] d) PBS-Tでwellを3回洗浄した。

[0060] e) 上記の糞便抽出物または5倍希釈BALFを50μL/well加え、37℃で1時間処理した。

[0061] f) PBS-Tでwellを3回洗浄した。

[0062] g) 二次抗体（HRP-conjugated anti-mouse IgA、Bethyl Laboratories製）を50μL/well加え、37℃で1時間処理した。

[0063] h) PBS-Tでwellを3回洗浄した。

[0064] i) 基質溶液（0.4mg/mL o-phenylenediamine + 10μL/mL H₂O₂）を50μL/well加え、室温で20分間放置した。

[0065] j) 4N硫酸（25μL/well）を加え、反応を停止させた。

[0066] k) 490nmで吸光度を測定し、糞便抽出物の場合には3本のチューブに分割してそれぞれを測定し、5倍希釈BALFの場合には各サンプルを2

回測定した。その平均値を用いて、検量線からIgA量を求めた。

[0067] なお、検量線は、次のように作成した。すなわち、マウスIgA (Bethyl Laboratories製) を、6.25、12.5、25、50、100、200、1000、及び5000 ng/mLの濃度でそれぞれ調製し、各濃度のマウスIgAを、50 μ L/wellずつELISA用96-well platesに加え（各濃度当たり3 wells）、37℃、1時間処理後、上記のb), c), d), g) ~ k) の操作を行い、IgA量と490 nmでの吸光度測定値から、検量線を作成した。

[0068] 感染14日後における糞便抽出物のIgA量を図11、図17に示す。また、感染14日後における5倍希釈BALFのIgA量を図12、図18に示す。

[0069] 図11、図12に示すように、サンプルとしてエタノール抽出物DE、DE'、熱水抽出物DW、DW'、DOを投与した群では、Control群、及びオセルタミビルを投与した群に比べて、IgA量が高かった。特に、エタノール抽出物DEを投与した群におけるIgA量の増加が顕著であった。

[0070] また、図17、図18に示すように、サンプルとしてエタノール抽出物DE、上清成分DL、沈降成分DHを投与した群では、Control群、及びオセルタミビルを投与した群に比べて、IgA量が高かった。

[0071] 本開示に係る抗ウイルス剤は、微細藻類シュードコリスチス エリプソイディア セキグチ エト クラノ ジェン エト エスピー ノブ (Pseudochoricystis ellipsoidea Sekiguchi et Kurano gen. et sp. nov.) MB1C11204株から抽出された抽出物を有効成分として含有する。本開示の抗ウイルス剤は、高い抗ウイルス活性を奏する。

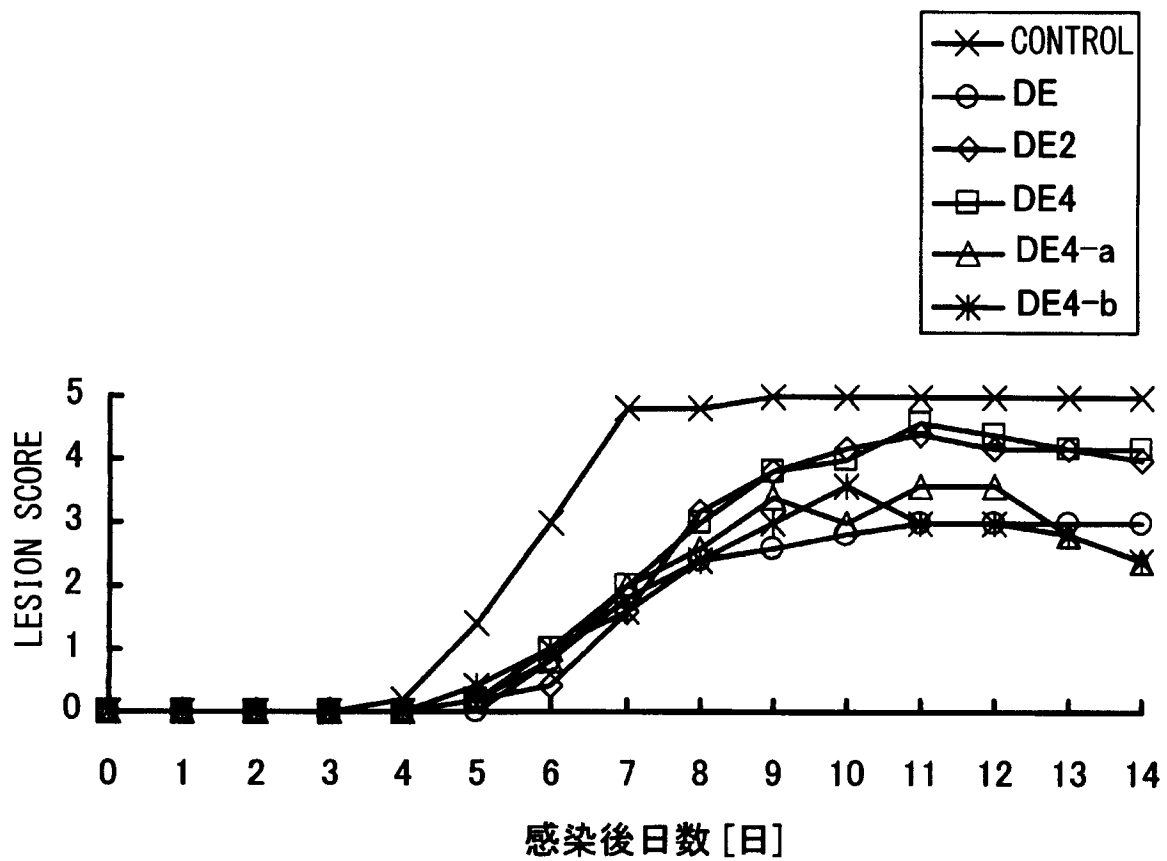
[0072] 以上、本開示に係る抗ウイルス剤の実施形態、構成、態様を例示したが、本開示に係る実施形態、構成、態様は、上述した各実施形態、各構成、各態様に限定されるものではない。例えば、異なる実施形態、構成、態様にそれぞれ開示された技術的部を適宜組み合わせ得られる実施形態、構成、態様

についても本開示に係る実施形態、構成、態様の範囲に含まれる。

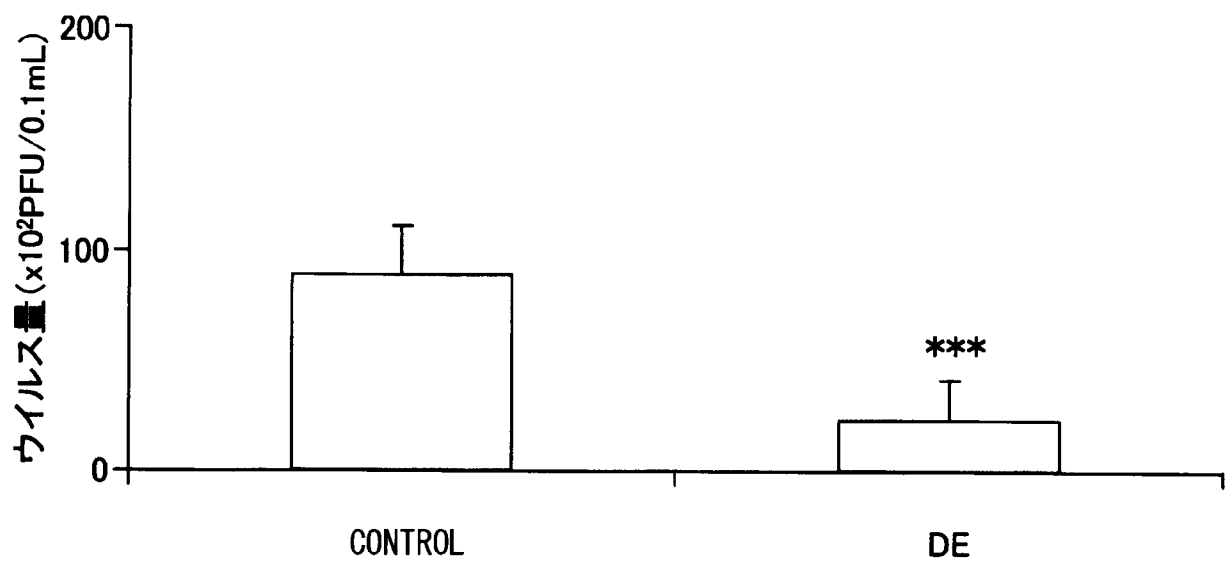
請求の範囲

- [請求項1] 微細藻類シュードコリスチス エリプソイディア セキグチ エトクラノ ジェンエト エスピー ノブMBIC11204株抽出物を有効成分として含有する抗ウイルス剤。
- [請求項2] 前記微細藻類抽出物は、前記微細藻類からアルコールを用いて抽出された抽出物である請求項1に記載の抗ウイルス剤。
- [請求項3] 前記アルコールは、エタノールである請求項2に記載の抗ウイルス剤。
- [請求項4] 前記微細藻類抽出物は、前記微細藻類からアルコールを用いて抽出した後の前記微細藻類産物から、熱水を用いて抽出される請求項1に記載の抗ウイルス剤。
- [請求項5] 前記熱水は、85℃である請求項4に記載の抗ウイルス剤。
- [請求項6] 単純ヘルペスウイルス2型およびA型インフルエンザウイルスを対象とする請求項1に記載の抗ウイルス剤。

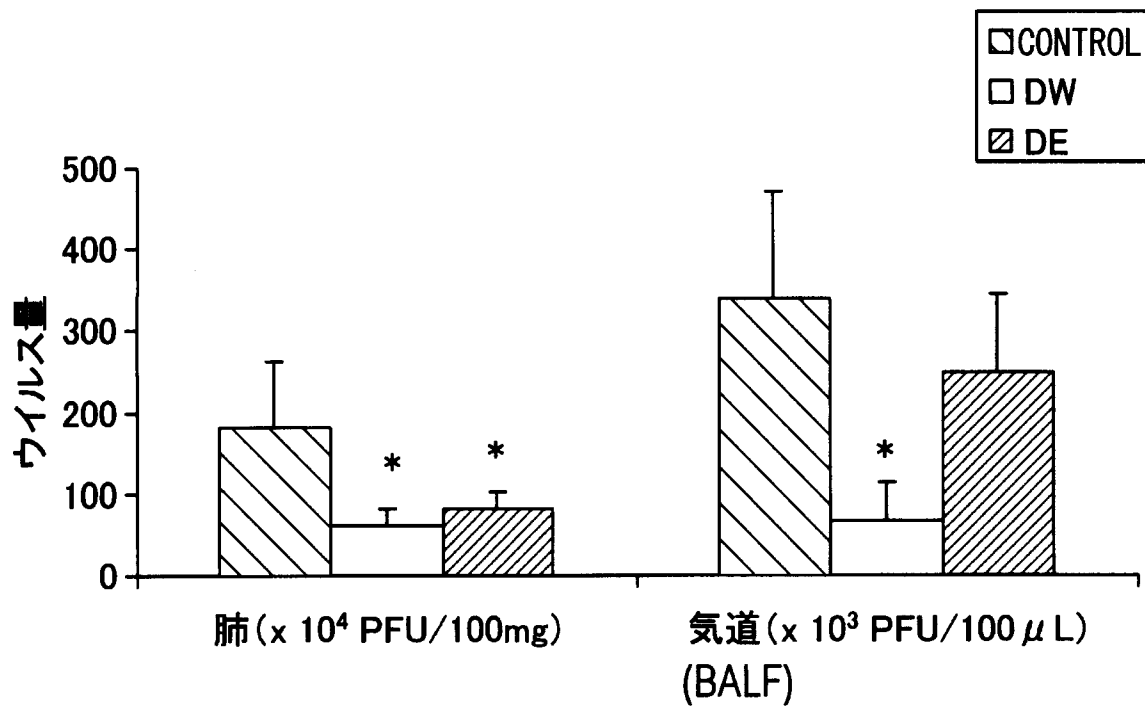
[図1]



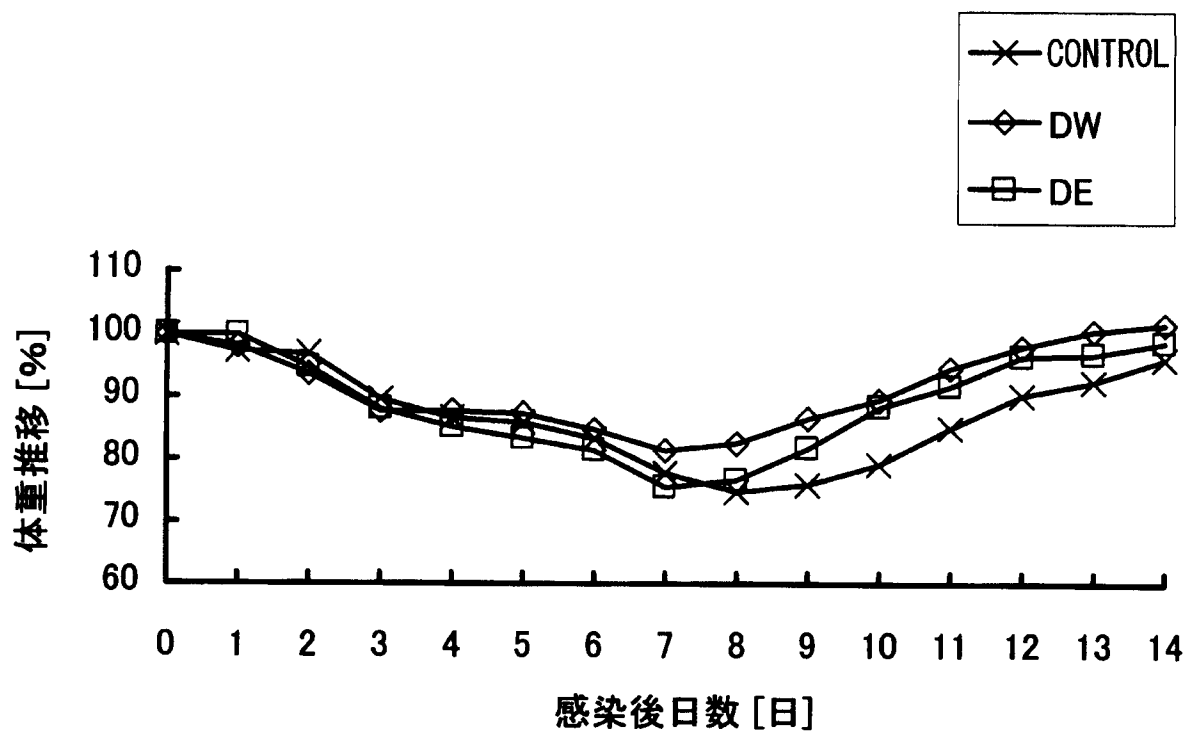
[図2]



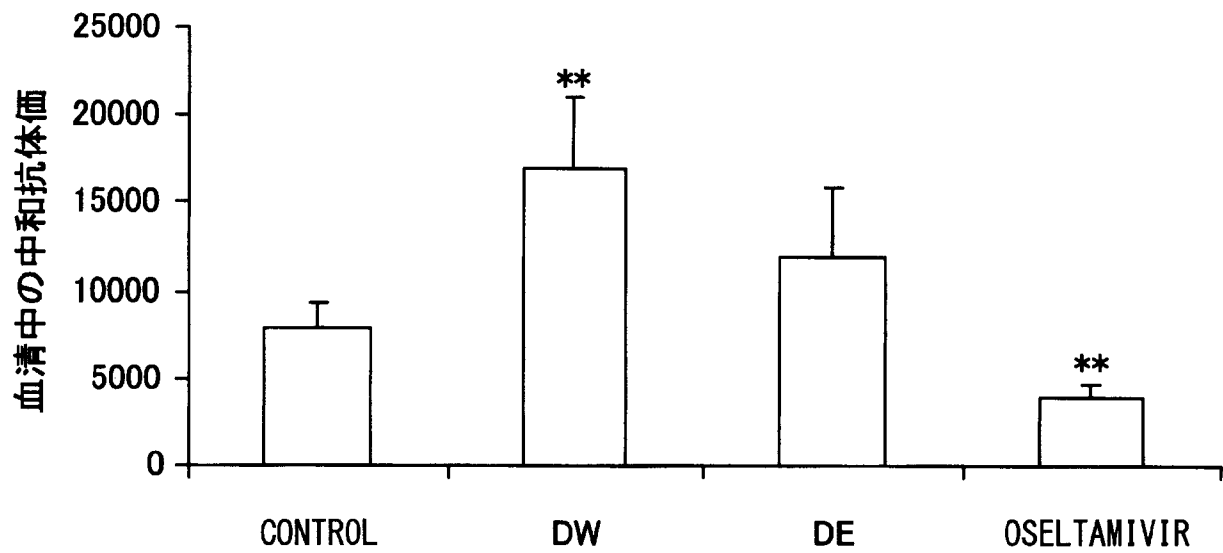
[図3]



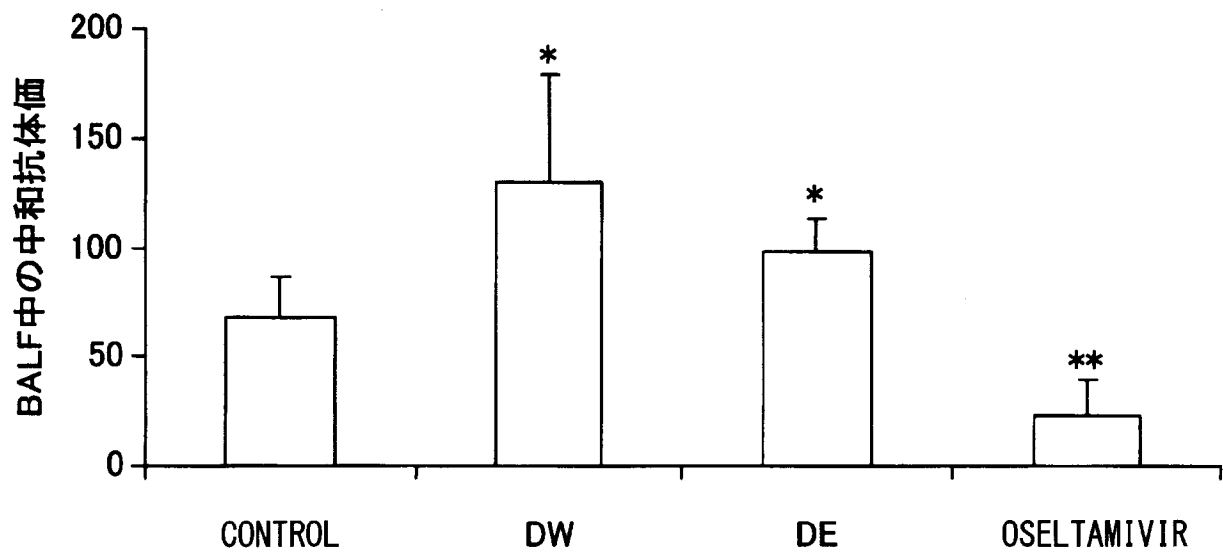
[図4]



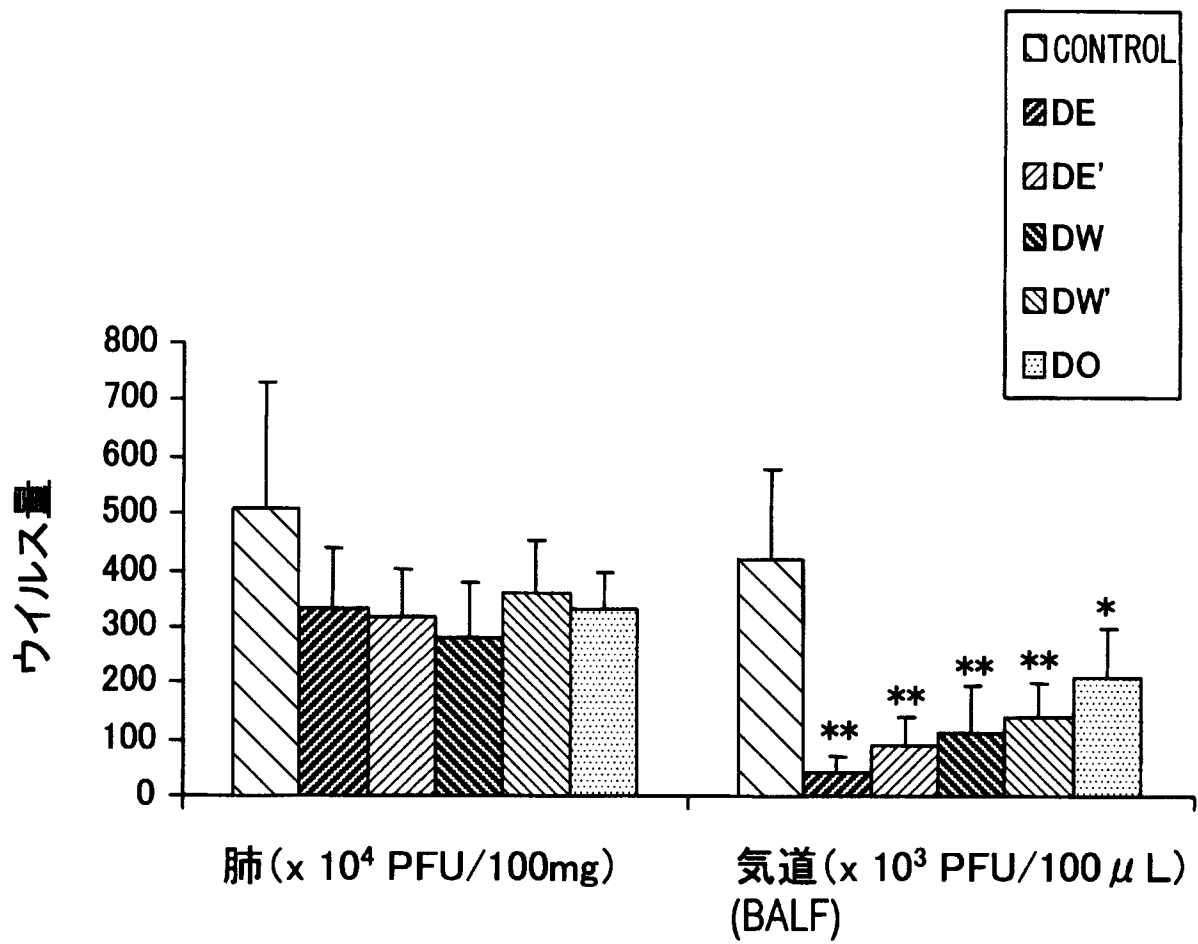
[図5]



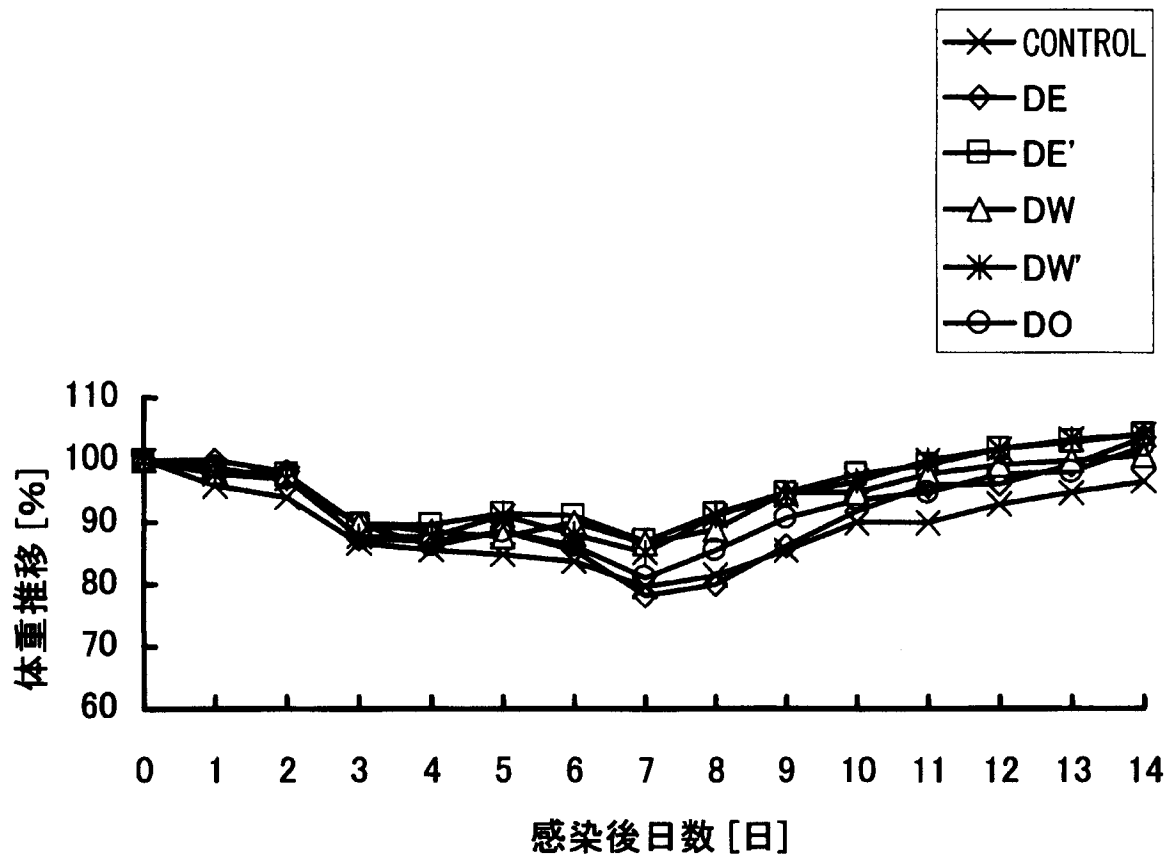
[図6]



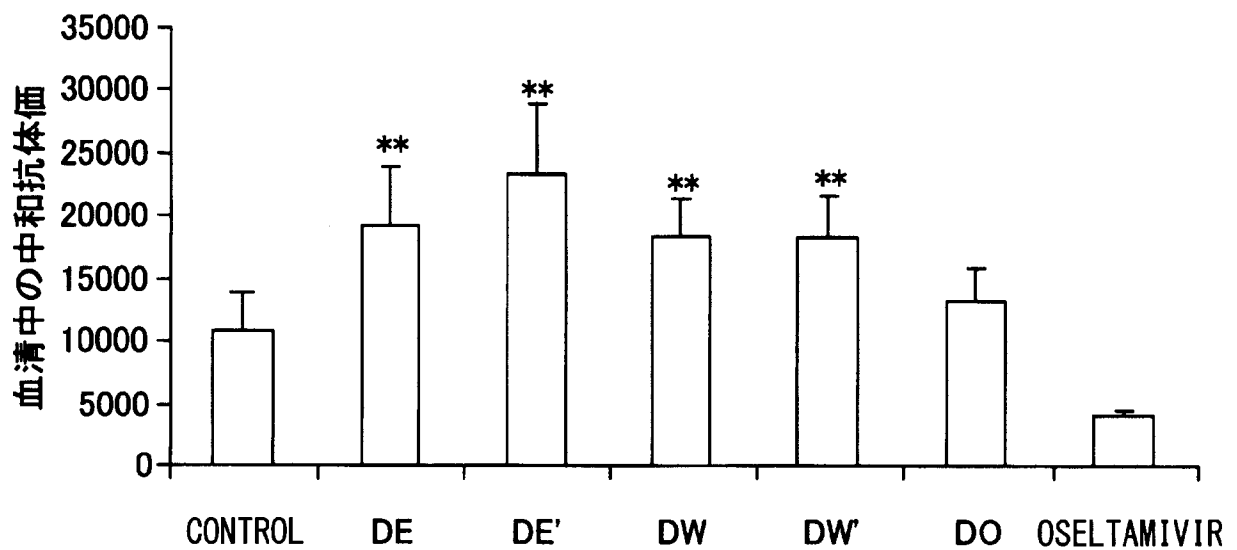
[図7]



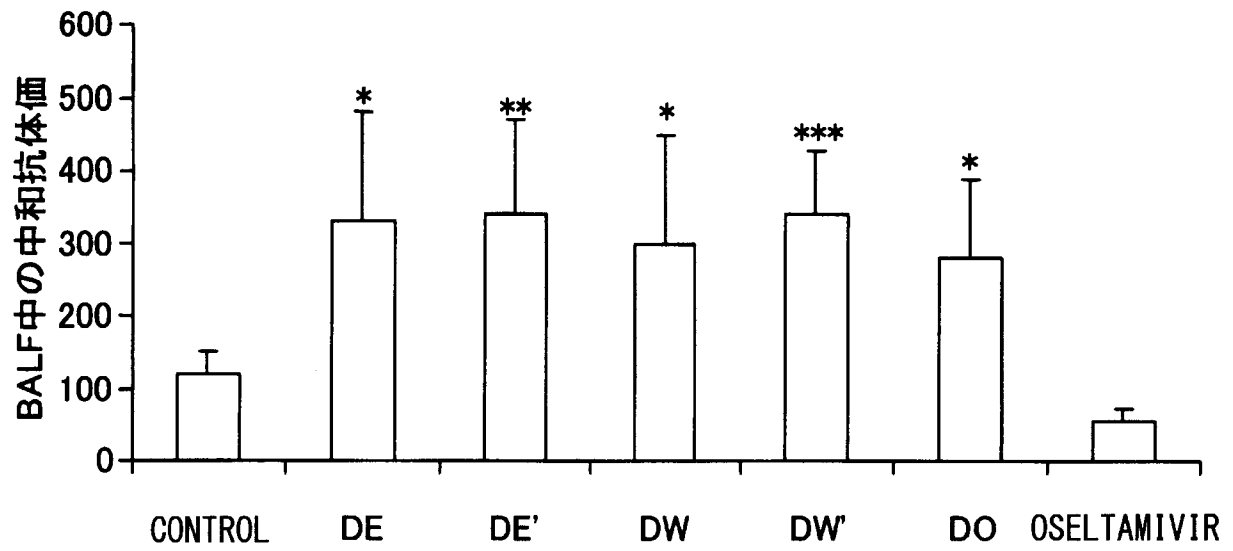
[図8]



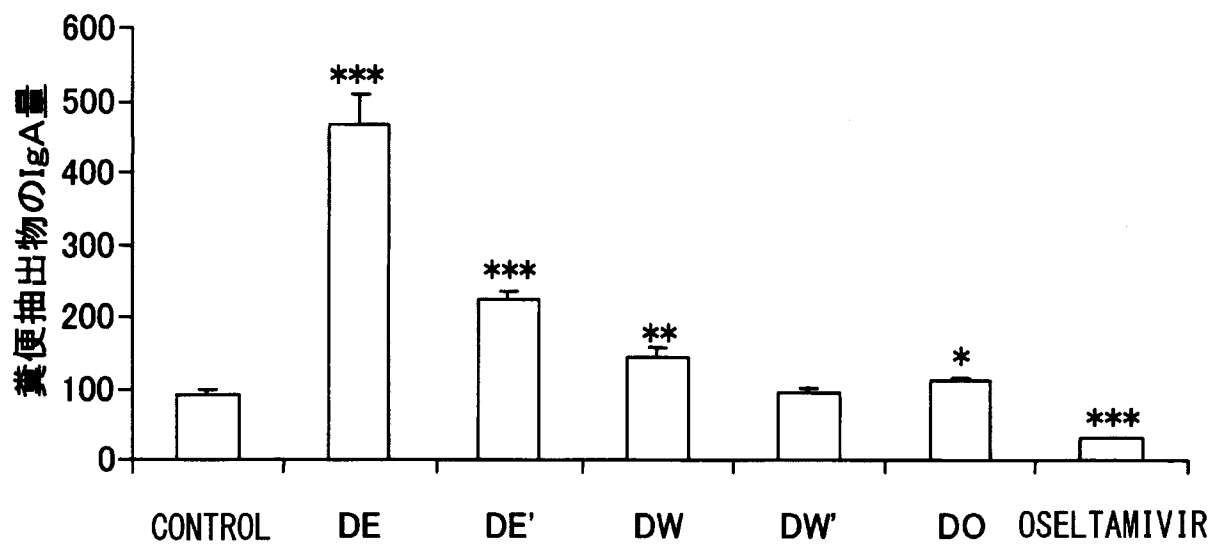
[図9]



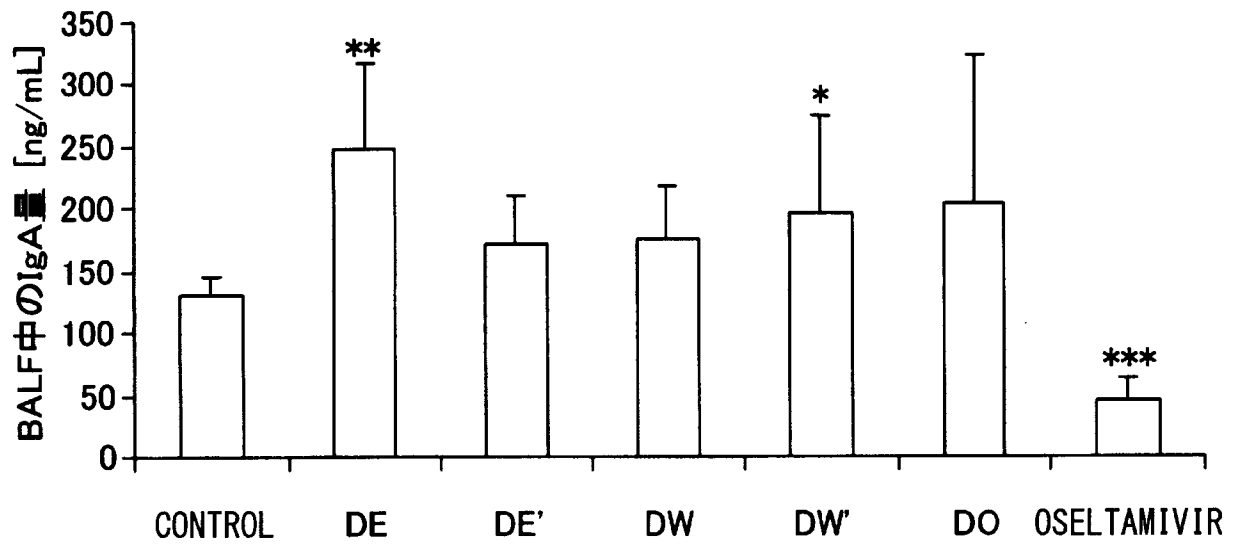
[図10]



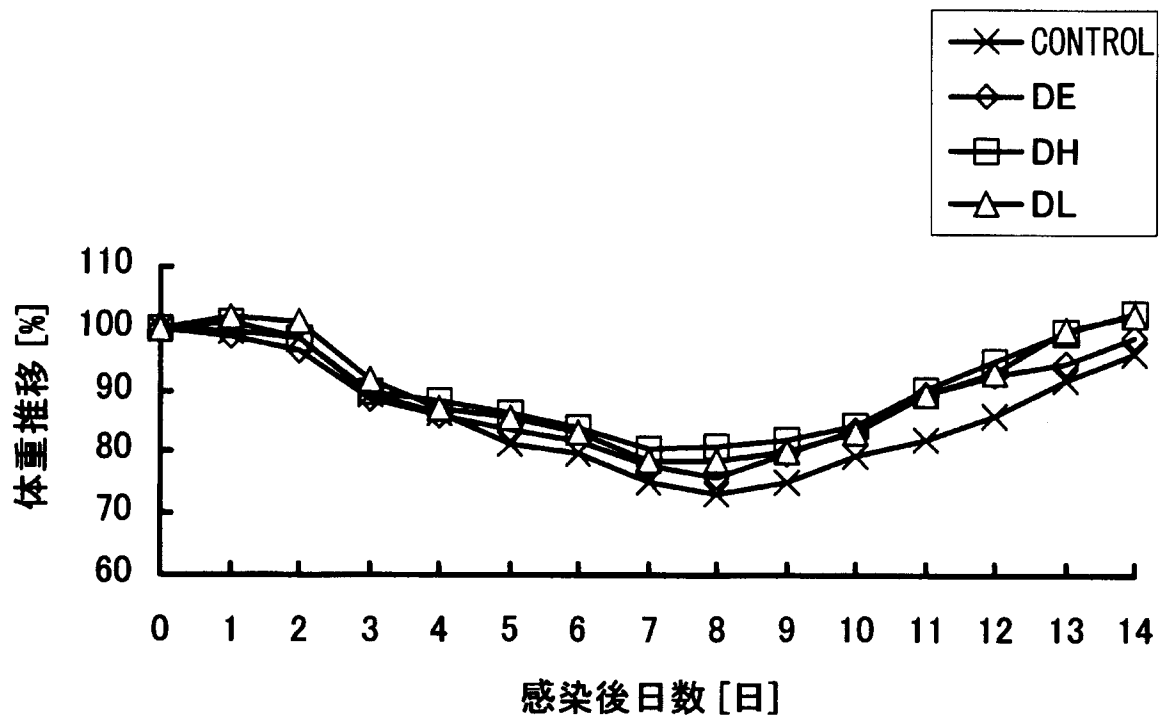
[図11]



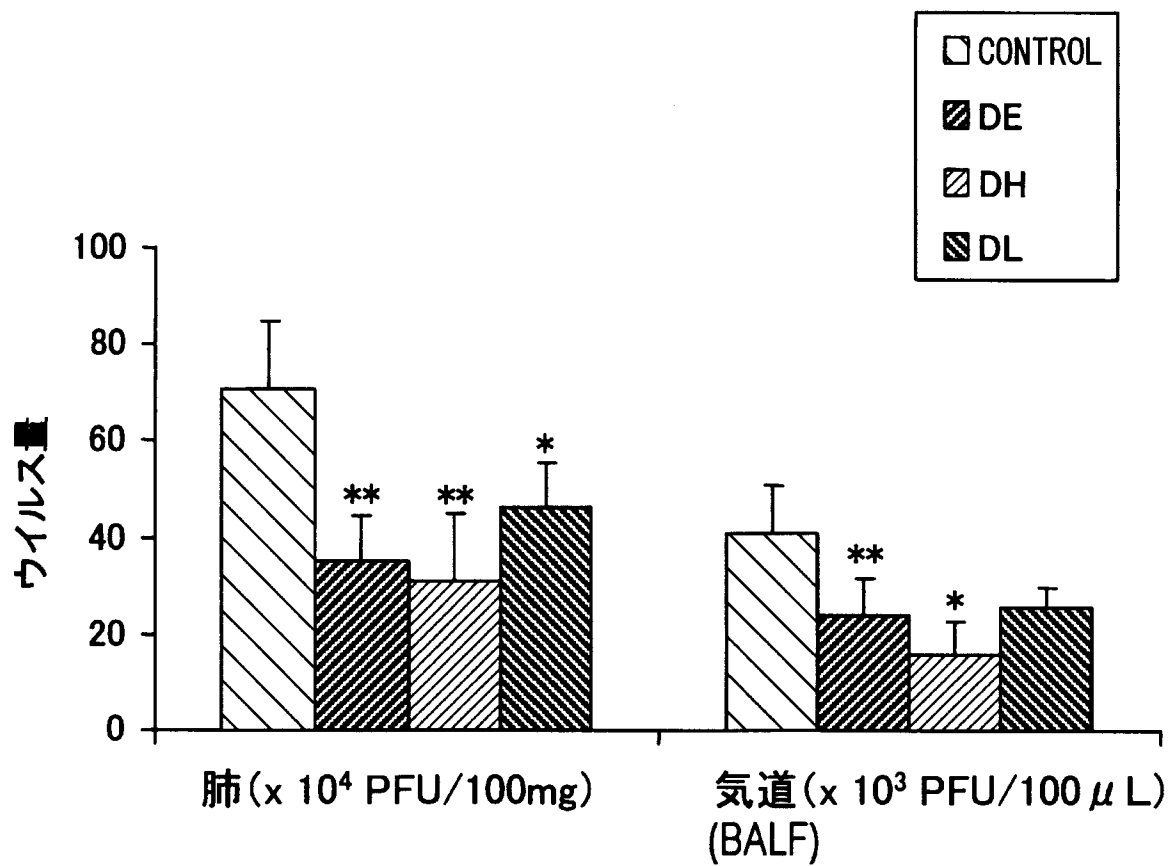
[図12]



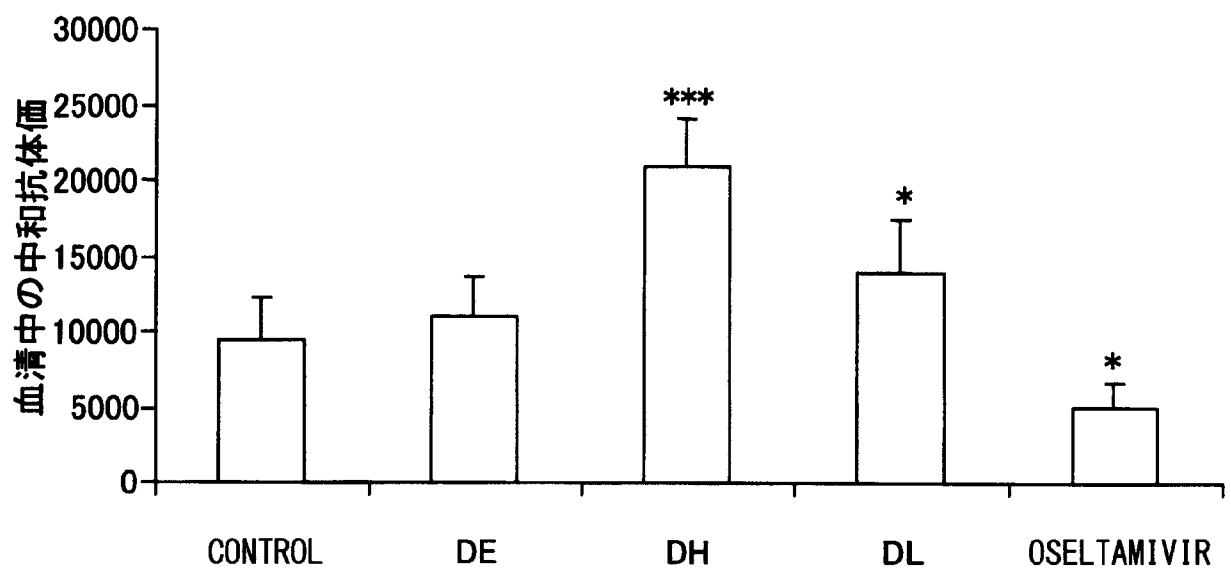
[図13]



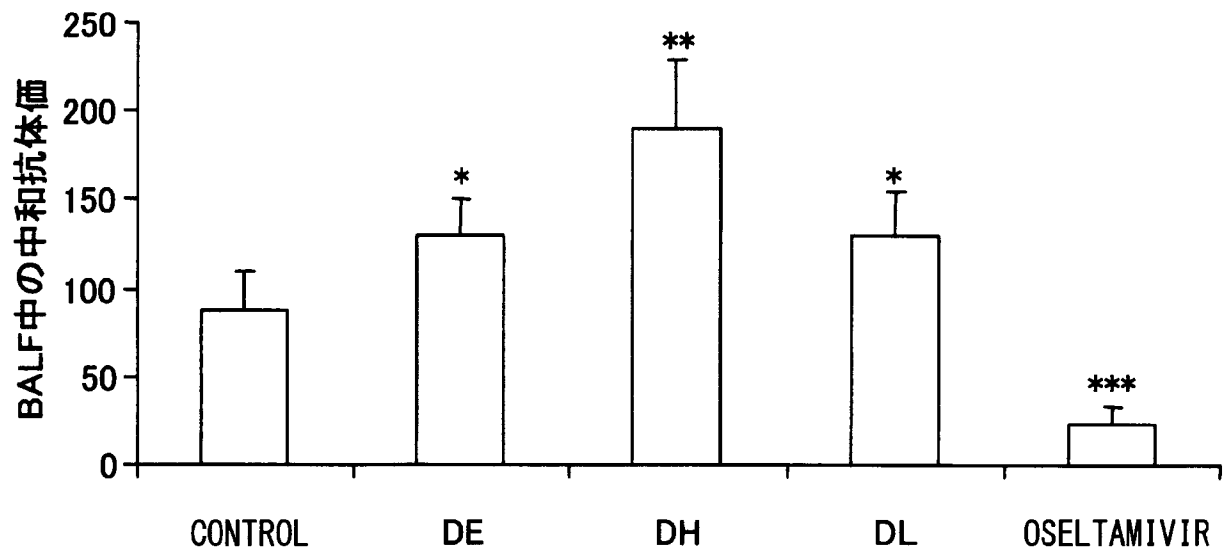
[図14]



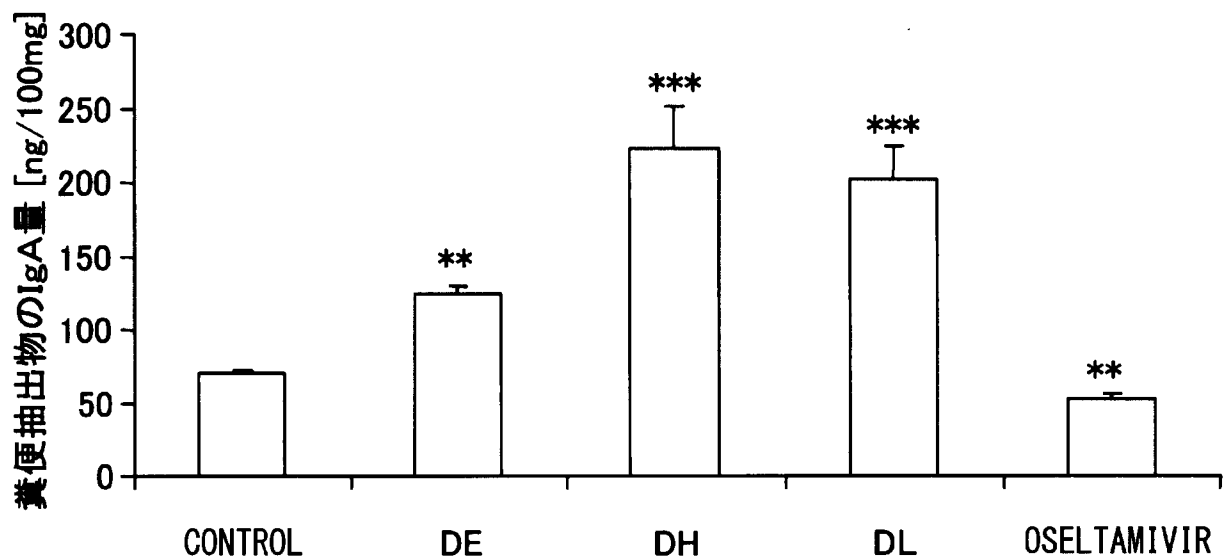
[図15]



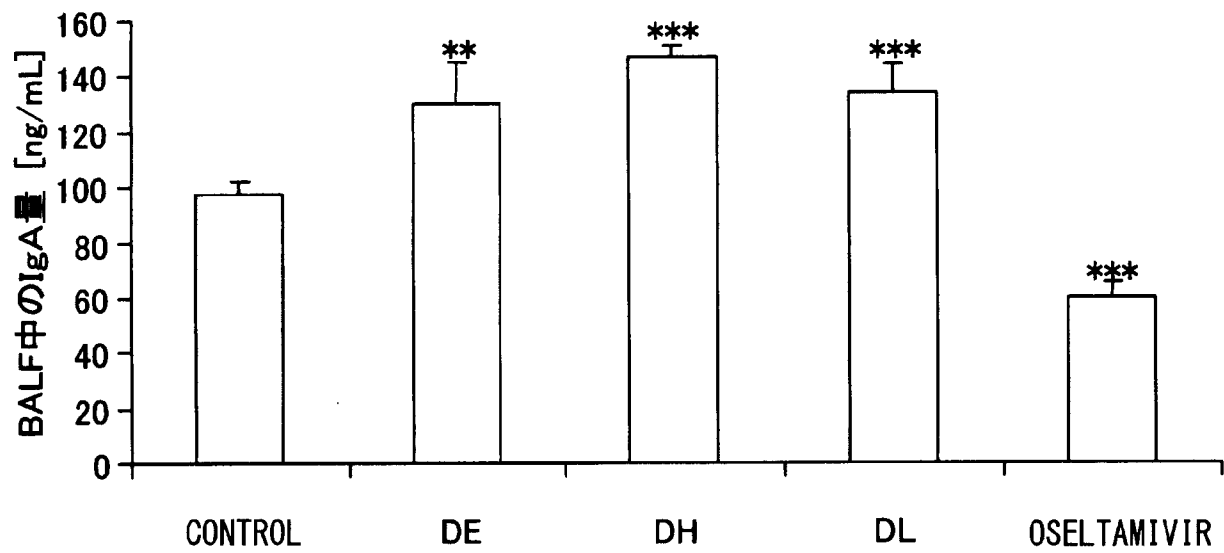
[図16]



[図17]



[図18]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/004305

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K36/02(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i, A61P31/20(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)

A61K36/02, A61P31/12, A61P31/16, A61P31/20

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2005-247757 A (Nikken Sohonssha Corp.), 15 September 2005 (15.09.2005), claims; examples (Family: none)	1-6
Y	Society of Genome Microbiology, Japan Nenkai Program, 2013.03, pages 24 to 31, URL < http://www.sgmj.org/2013/docs/poster1P.pdf > page 31, the last paragraph	1-6

☐ 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
30 October, 2014 (30.10.14)

Date of mailing of the international search report
11 November, 2014 (11.11.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. A61K36/02(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i, A61P31/20(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（I P C）） Int.Cl. A61K36/02, A61P31/12, A61P31/16, A61P31/20		
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 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014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） CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)		
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
Y	JP 2005-247757 A（株式会社日健総本社）2005.09.15, 特許請求の範囲、実施例（ファミリーなし）	1-6
Y	日本ゲノム微生物学会年会プログラム, 2013.03, pp.24-31, URL < http://www.sgmj.org/2013/docs/poster1P.pdf > 第31頁最終段	1-6
☐ 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」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願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 30.10.2014	国際調査報告の発送日 11.11.2014	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 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） 鈴木 理文 電話番号 03-3581-1101 内線 3439	4U 4431