

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5394233号  
(P5394233)

(45) 発行日 平成26年1月22日(2014.1.22)

(24) 登録日 平成25年10月25日(2013.10.25)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>GO 1 N 33/50</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/50	Z
<b>GO 1 N 33/15</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/15	Z
<b>A 2 3 L 1/30</b>	<b>(2006.01)</b>	A 2 3 L 1/30	B
<b>A 6 1 K 45/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 2 3 L 1/30	A
<b>A 6 1 K 36/18</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	

請求項の数 14 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-509376 (P2009-509376)	(73) 特許権者	501481492 株式会社ゲノム創薬研究所 東京都文京区本郷1-27-8-1207
(86) (22) 出願日	平成20年4月10日(2008.4.10)	(73) 特許権者	504137912 国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷七丁目3番1号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2008/057105	(73) 特許権者	507116994 イマジン・グローバル・ケア株式会社 東京都中央区日本橋一丁目2番10号東洋ビル6F
(87) 国際公開番号	W02008/126905	(74) 代理人	100125748 弁理士 高橋 徳明
(87) 国際公開日	平成20年10月23日(2008.10.23)	(72) 発明者	関水 和久 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
審査請求日	平成23年1月24日(2011.1.24)		
(31) 優先権主張番号	特願2007-102918 (P2007-102918)		
(32) 優先日	平成19年4月10日(2007.4.10)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自然免疫機構を活性化/抑制する作用を有する物質の評価方法及びスクリーニング方法、並びに、自然免疫機構を活性化/抑制するための薬剤、食品及びそれらの製造方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

被検物質が自然免疫機構を活性化させる作用を有するか否かを評価する方法であって、  
 (a) 自然免疫機構を有する生物に前記被検物質を投与する工程、及び、  
 (b) 前記被検物質が前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させるか否かを評価する工程  
 を含むことを特徴とする方法。

## 【請求項2】

自然免疫機構を活性化させる作用を有する物質をスクリーニングする方法であって、  
 (a) 自然免疫機構を有する生物に被検物質を投与する工程、  
 (b) 前記被検物質が前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させるか否かを評価する工程、及び、  
 (c) 前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させると評価された物質を選択する工程  
 を含むことを特徴とする方法。

## 【請求項3】

自然免疫機構を有する生物が、自然免疫機構のみを有する生物である請求項1から2のいずれかに記載の方法。

## 【請求項4】

自然免疫機構のみを有する生物が、昆虫類に属する生物である請求項3に記載の方法。

## 【請求項 5】

昆虫類に属する生物が、カイコの幼虫である請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

自然免疫機構を活性化させるための薬剤の製造方法であって、

- (a) 自然免疫機構を有する生物に被検物質を投与する工程、
- (b) 前記被検物質が前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させるか否かを評価する工程、
- (c) 前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させると評価された物質を選択する工程、
- (d) 前記工程 (c) で選択された物質を生成する工程、及び、
- (e) 前記工程 (d) で生成された物質と、薬学的に許容され得る担体とを混合する工程を含むことを特徴とする製造方法。

10

## 【請求項 7】

自然免疫機構を活性化させる作用を有する食品の製造方法であって、

- (a) 自然免疫機構を有する生物に被検物質を投与する工程、
- (b) 前記被検物質が前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させるか否かを評価する工程、
- (c) 前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させると評価された物質を選択する工程、
- (d) 前記工程 (c) で選択された物質を生成する工程、及び、
- (e) 前記工程 (d) で生成された物質と、食品原料とを混合する工程を含むことを特徴とする製造方法。

20

## 【請求項 8】

被検物質が自然免疫機構を抑制する作用を有するか否かを評価する方法であって、

- (a') 自然免疫機構を有する生物に前記被検物質及び自然免疫活性化物質を投与する工程、並びに、
- (b') 前記被検物質が前記自然免疫活性化物質による前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制するか否かを評価する工程を含むことを特徴とする方法。

30

## 【請求項 9】

自然免疫機構を抑制する作用を有する物質をスクリーニングする方法であって、

- (a') 自然免疫機構を有する生物に被検物質及び自然免疫活性化物質を投与する工程、
- (b') 前記被検物質が前記自然免疫活性化物質による前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制するか否かを評価する工程、並びに、
- (c') 前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制すると評価された物質を選択する工程を含むことを特徴とする方法。

## 【請求項 10】

自然免疫機構を有する生物が、自然免疫機構のみを有する生物である請求項 8 から 9 のいずれかに記載の方法。

40

## 【請求項 11】

自然免疫機構のみを有する生物が、昆虫類に属する生物である請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

昆虫類に属する生物が、カイコの幼虫である請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

自然免疫機構を抑制するための薬剤の製造方法であって、

- (a') 自然免疫機構を有する生物に被検物質及び自然免疫活性化物質を投与する工程、
- (b') 前記被検物質が前記自然免疫活性化物質による前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制するか否かを評価する工程、

50

(c') 前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制すると評価された物質を選択する工程、

(d') 前記工程(c')で選択された物質を生成する工程、並びに、

(e') 前記工程(d')で生成された物質と、薬学的に許容され得る担体とを混合する工程

を含むことを特徴とする製造方法。

【請求項14】

自然免疫機構を抑制する作用を有する食品の製造方法であって、

(a') 自然免疫機構を有する生物に被検物質及び自然免疫活性化物質を投与する工程、

(b') 前記被検物質が前記自然免疫活性化物質による前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制するか否かを評価する工程、

(c') 前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制すると評価された物質を選択する工程、

(d') 前記工程(c')で選択された物質を生成する工程、並びに、

(e') 前記工程(d')で生成された物質と、食品原料とを混合する工程

を含むことを特徴とする製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、自然免疫機構を活性化/抑制する作用を有する物質の評価方法及びスクリーニング方法、並びに、自然免疫機構を活性化/抑制するための薬剤、食品、及びそれらの製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒト等の高等な脊椎動物は、自然免疫と獲得免疫の2種類の免疫機構(免疫系)を有し、双方の免疫機構が適切に作用することで感染源からの防御を行っている。一方で、昆虫類等の残りの多くの生物は、獲得免疫機構を有さず、自然免疫機構のみで感染源からの防御を行っている。

自然免疫機構は生物が共通に有する感染防御機構であり、非特異的であるために反応が素早く、多くの感染源に対して有効に機能することが特徴である。ヒト等の高等な脊椎動物においても、感染初期の抵抗性、癌や生活習慣病の予防、組織修復等の観点からは、感染源に特異的な獲得免疫よりも、非特異的な自然免疫の方がより重要な位置を占めていると考えられる。

多くの感染源の感染は、自然免疫機構においてマクロファージや樹状細胞等の抗原提示細胞を活性化し、IL-1、IL-6、IL-12、TNF-等のサイトカインの産生を誘導する。これらのサイトカインはNK細胞に作用してIFN-の産生を誘導する。この産生されたIFN-はマクロファージに作用してIL-12等の産生を増幅するほか、NOの産生等も誘導する。NOは速やかに酸素やスーパーオキシドと反応し、その過程で生じた様々な化学物質により感染源を破壊する。

【0003】

自然免疫機構の異常は様々な疾患を引き起こす原因となり、したがって、このような自然免疫機構を所望に調節することが可能な、優れた自然免疫活性化剤や自然免疫抑制剤の開発が望まれている。従来、このような自然免疫活性化剤や自然免疫抑制剤の有効成分となり得る物質を探索する場合には、培養した哺乳動物のマクロファージ等の免疫担当細胞に被検物質を加え、IL-6やTNF-等のサイトカインの放出をELISA等により検出するという方法がとられてきた。

しかしながら、このような従来の方法では、細胞培養を行うための設備が必要であり、また、個体に投与した場合に個体の体内動態に問題のある物質でも探索されてしまうという問題があった。また、被検物質に混入した細菌由来のリポポリサッカライド(LPS)が反応してしまい、そのため多くの被検物質が擬陽性を示してしまい、新規物質を探索す

10

20

30

40

50

る上での障害となっていた。

近年、遺伝子導入したショウジョウバエを利用して自然免疫機構に作用する物質をスクリーニングする方法が提案されているが（例えば、特許文献1参照）、体長が非常に小さいため、カイコ幼虫等で可能な、体液あるいは腸管内への試験液の一定量の注射は困難である。また、カイコ幼虫等で可能な、臓器を取り出して薬理学的実験に供することも困難である。更に、この方法においては、抗菌ペプチド遺伝子の下流にレポーター遺伝子を導入しているため、特定の抗菌ペプチドが関係するメカニズムしか検出できないという問題もある。

【0004】

【特許文献1】特開2004-121155号公報

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、前記諸問題を解決し、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、個体の体内動態に問題のある物質を排除することができ、探索時に混入し得る細菌由来のリポポリサッカライド（LPS）の影響を受けず、あるいは簡便に自然免疫機構を活性化/抑制する作用を有する物質を探索することができる評価方法及びスクリーニング方法を提供することを目的とする。更に本発明は、該方法により得られる自然免疫を活性化/抑制する作用を有する物質、並びに、該物質を利用した自然免疫機構を活性化/抑制するための薬剤、食品、及びそれらの製造方法を提供することをも目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

前記課題を解決するため、本発明者らは鋭意検討した結果、カイコ幼虫等の自然免疫機構を有する生物において、自然免疫機構と筋肉収縮機構とが密接に関連しているという知見を得た。そして、これら2つの機構の関連においては、次のメカニズムの存在が見出された。

即ち、まず、ペプチドグリカン等の自然免疫活性化物質は、免疫担当細胞（或いは体液性）の受容体に結合し、結果として活性酸素種（ROS）が産生される。それがプロテアーゼのカスケードを促進し、カイコ幼虫の麻痺ペプチドBmPPの前駆体（不活性型）から活性化体への変化をもたらす。そして、活性化されたBmPPが、直接（或いは間接）に筋肉細胞に作用し、筋肉の収縮を促す。

30

本発明者らは、この新たな知見を利用することにより、カイコ幼虫等の自然免疫機構を有する生物における筋肉収縮を指標として、自然免疫機構を活性化/抑制する作用を有する物質を効率的、かつ簡便にスクリーニングできることを見出した。更に、ウコン等の熱水抽出物に実際に自然免疫活性化作用が存在することを見出し、本発明の完成に至った。

【0007】

前記したように、従来、自然免疫機構を活性化/抑制する作用を有する物質を探索する場合には、培養したマクロファージ等の免疫担当細胞に被検物質を加え、IL-6やTNF-等のサイトカインの放出をELISA等により検出するという方法がとられてきたが、この方法では、細胞培養を行うための設備が必要であり、また、個体に投与した場合に個体の体内動態に問題のある物質でも探索されてしまうという問題があった。また、被検物質に混入した細菌由来のLPSが反応してしまい、そのため多くの被検物質が自然免疫機構を活性化する作用を有する可能性を示してしまい（擬陽性を示してしまい）、新規物質を探索する上での障害となっていた。

40

これに対して、カイコ幼虫等の筋肉収縮を指標とした本発明のスクリーニング（探索）方法では、大掛かりな設備は不要であり、極めて簡便に自然免疫機構を活性化/抑制する作用を有する物質を探索することが可能となる。また、カイコ幼虫等の個体に対して被検物質を投与するので、個体の体内動態に問題のある物質を探索時に排除することができる。更に、カイコ幼虫等では、細菌由来のリポポリサッカライド（LPS）に対して筋肉収縮は起こらないため（実施例参照、後述）、被検物質に混入した細菌由来のLPSによる

50

擬陽性の問題を解消することが可能となり、LPS以外の自然免疫活性化物質を検出することが可能となる。

【0008】

本発明は、本発明者らの前記知見に基づくものであり、前記課題を解決するための手段としては、以下の通りである。即ち、

< 1 > 被検物質が自然免疫機構を活性化させる作用を有するか否かを評価する方法であって、

( a ) 自然免疫機構を有する生物に前記被検物質を投与する工程、及び、

( b ) 前記被検物質が前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させるか否かを評価する工程

10

を含むことを特徴とする方法である（第1の評価方法）。

< 2 > 自然免疫機構を活性化させる作用を有する物質をスクリーニングする方法であって、

( a ) 自然免疫機構を有する生物に被検物質を投与する工程、

( b ) 前記被検物質が前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させるか否かを評価する工程、及び、

( c ) 前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させると評価された物質を選択する工程

を含むことを特徴とする方法である（第1のスクリーニング方法）。

< 3 > 自然免疫機構を有する生物が、自然免疫機構のみを有する生物である前記< 1 > から< 2 > のいずれかに記載の方法である。

20

< 4 > 自然免疫機構のみを有する生物が、昆虫類に属する生物である前記< 3 > に記載の方法である。

< 5 > 昆虫類に属する生物が、カイコの幼虫である前記< 4 > に記載の方法である。

< 6 > 自然免疫機構を活性化させるための薬剤の製造方法であって、

( a ) 自然免疫機構を有する生物に被検物質を投与する工程、

( b ) 前記被検物質が前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させるか否かを評価する工程、

( c ) 前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させると評価された物質を選択する工程、

30

( d ) 前記工程 ( c ) で選択された物質を生成する工程、及び、

( e ) 前記工程 ( d ) で生成された物質と、薬学的に許容され得る担体とを混合する工程を含むことを特徴とする製造方法である（第1の薬剤の製造方法）。

< 7 > 自然免疫機構を活性化させる作用を有する食品の製造方法であって、

( a ) 自然免疫機構を有する生物に被検物質を投与する工程、

( b ) 前記被検物質が前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させるか否かを評価する工程、

( c ) 前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させると評価された物質を選択する工程、

( d ) 前記工程 ( c ) で選択された物質を生成する工程、及び、

40

( e ) 前記工程 ( d ) で生成された物質と、食品原料とを混合する工程を含むことを特徴とする製造方法である（第1の食品の製造方法）。

< 8 > 自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させる作用を有する物質を有効成分とすることを特徴とする自然免疫活性化剤である。

< 9 > 自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させる作用を有する物質が、野菜の抽出物乃至精製物である前記< 8 > に記載の自然免疫活性化剤である。

< 10 > 自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させる作用を有する物質が、ウコンの抽出物乃至精製物である前記< 8 > から< 9 > のいずれかに記載の自然免疫活性化剤である。

< 11 > 自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させる作用を有する物質を含むこと

50

を特徴とする自然免疫活性化作用を有する食品である。

< 1 2 > 自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させる作用を有する物質が、野菜の抽出物乃至精製物である前記< 1 1 >に記載の食品である。

< 1 3 > 自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させる作用を有する物質が、ウコンの抽出物乃至精製物である前記< 1 1 >から< 1 2 >のいずれかに記載の食品である。

< 1 4 > 被検物質が自然免疫機構を抑制する作用を有するか否かを評価する方法であって、

( a ' ) 自然免疫機構を有する生物に前記被検物質及び自然免疫活性化物質を投与する工程、並びに、

( b ' ) 前記被検物質が前記自然免疫活性化物質による前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制するか否かを評価する工程

を含むことを特徴とする方法である(第2の評価方法)。

< 1 5 > 自然免疫機構を抑制する作用を有する物質をスクリーニングする方法であって、

( a ' ) 自然免疫機構を有する生物に被検物質及び自然免疫活性化物質を投与する工程、

( b ' ) 前記被検物質が前記自然免疫活性化物質による前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制するか否かを評価する工程、並びに、

( c ' ) 前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制すると評価された物質を選択する工程

を含むことを特徴とする方法である(第2のスクリーニング方法)。

< 1 6 > 自然免疫機構を有する生物が、自然免疫機構のみを有する生物である前記< 1 4 >から< 1 5 >のいずれかに記載の方法である。

< 1 7 > 自然免疫機構のみを有する生物が、昆虫類に属する生物である前記< 1 6 >に記載の方法である。

< 1 8 > 昆虫類に属する生物が、カイコの幼虫である前記< 1 7 >に記載の方法である。

< 1 9 > 自然免疫機構を抑制するための薬剤の製造方法であって、

( a ' ) 自然免疫機構を有する生物に被検物質及び自然免疫活性化物質を投与する工程、

( b ' ) 前記被検物質が前記自然免疫活性化物質による前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制するか否かを評価する工程、

( c ' ) 前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制すると評価された物質を選択する工程、

( d ' ) 前記工程( c ' )で選択された物質を生成する工程、並びに、

( e ' ) 前記工程( d ' )で生成された物質と、薬学的に許容され得る担体とを混合する工程

を含むことを特徴とする製造方法である(第2の薬剤の製造方法)。

< 2 0 > 自然免疫機構を抑制する作用を有する食品の製造方法であって、

( a ' ) 自然免疫機構を有する生物に被検物質及び自然免疫活性化物質を投与する工程、

( b ' ) 前記被検物質が前記自然免疫活性化物質による前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制するか否かを評価する工程、

( c ' ) 前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制すると評価された物質を選択する工程、

( d ' ) 前記工程( c ' )で選択された物質を生成する工程、並びに、

( e ' ) 前記工程( d ' )で生成された物質と、食品原料とを混合する工程

を含むことを特徴とする製造方法である(第2の食品の製造方法)。

< 2 1 > 自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制する作用を有する物質を有効成分とすることを特徴とする自然免疫抑制剤である。

< 2 2 > 自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制する作用を有する物質を含むことを特徴とする自然免疫抑制作用を有する食品である。

【発明の効果】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 9 】

本発明によれば、前記従来における諸問題を解決し、前記目的を達成することができ、個体の体内動態に問題のある物質を排除することができ、探索時に混入し得る細菌由来のリポポリサッカライド（LPS）の影響を受けない。すなわち本発明によれば、LPSが反応しないので、LPS以外の自然免疫活性化物質を検出することが可能である。また、簡便に自然免疫機構を活性化/抑制する作用を有する物質を探索することができる評価方法及びスクリーニング方法、自然免疫機構を活性化/抑制するための薬剤、食品、及びそれらの製造方法を提供することができる。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 1 0 】

【 図 1 】 図 1 は、ペプチドグリカンによるカイコ幼虫の筋肉収縮を示した図である。

【 図 2 】 図 2 は、ペプチドグリカンによるカイコ幼虫の筋肉収縮に対するLグルタミン酸の影響を示した図である。

【 図 3 】 図 3 は、BmPPによるカイコ幼虫の筋肉収縮を示した図である。

【 図 4 】 図 4 は、BmPPによるカイコ幼虫の筋肉収縮に対するLグルタミン酸の影響を示した図である。

【 図 5 】 図 5 は、BmPP、ペプチドグリカンによるカイコ幼虫の筋肉収縮に対する抗BmPP抗体の影響を示した図である。

【 図 6 】 図 6 は、BmPP、ペプチドグリカン等によるカイコ幼虫の筋肉収縮に対するN-アセチルシステインの影響を示した図である。

【 図 7 】 図 7 は、細菌由来のLPSによってはカイコ幼虫の筋肉収縮が起こらないことを示した図である。

【 図 8 】 図 8 は、野菜の熱水抽出物によるカイコ幼虫の筋肉収縮を示した図である。

【 図 9 】 図 9 は、カイコ幼虫のバキュロウイルスによる感染死に対する野菜の熱水抽出物の治療効果を示した図である。

【 図 1 0 】 図 1 0 は、ウコンの熱水抽出物中におけるカイコ幼虫の筋肉収縮誘導物質を含む画分のDEAEセルロースカラムクロマトグラフィー結果を示した図である。

【 図 1 1 】 図 1 1 は、ウコン粉末の熱水抽出物及びDEAEセルロースカラムクロマトグラフィー精製画分によるマウスマクロファージの活性化を示した図である。

【 図 1 2 】 図 1 2 は、実施例 1 ~ 8 の結果から示唆される、カイコ幼虫における自然免疫系と筋肉収縮系との関連を示した図である。

## 【 発明を実施するための最良の形態 】

## 【 0 0 1 1 】

（第 1 の評価方法、第 1 のスクリーニング方法）

本発明の第 1 の評価方法は、被検物質が自然免疫機構を活性化させる作用を有するか否かを評価する方法であり、以下の工程（a）～工程（b）を含み、必要に応じて更にその他の工程を含む。

また、本発明の第 1 のスクリーニング方法は、自然免疫機構を活性化させる作用を有する物質をスクリーニングする方法であり、以下の工程（a）～工程（c）を含み、必要に応じて更にその他の工程を含む。

以下、前記第 1 の評価方法及び前記第 1 のスクリーニング方法を総称して、単に「第 1 の方法」と称することがある。

## 【 0 0 1 2 】

< 工程（a） >

前記第 1 の方法においては、自然免疫機構を有する生物に被検物質を投与する（工程（a））。

- 自然免疫機構を有する生物 -

本発明のスクリーニング方法は、上記したメカニズムにより自然免疫機構と筋肉収縮機構とが密接に関連しているという知見に基づくものであるため、前記「自然免疫機構を有する生物」としては、自然免疫の活性化に応答して筋肉の収縮が生じうる生物であれば、

10

20

30

40

50

特に制限はなく、任意の多細胞生物の中から目的に応じて適宜選択することができる。また、筋肉の収縮を指標とした自然免疫活性化の評価が可能である限り、個体の生死は問われない。

本発明においては、自然免疫機構を有する生物の中でも、特に自然免疫機構のみを有する生物を使用することが好ましい。前記「自然免疫機構」とは、獲得免疫（後天性免疫）機構によらない免疫的生体防御機構（先天性免疫機構）を意味する。脊椎動物は、病原体の侵入に対し、抗体等の侵入者を特異的に認識する分子を利用して生体を防御する獲得免疫機構を有するが、無脊椎動物はこのような獲得免疫機構を有しない。即ち、前記「自然免疫機構のみを有する生物」とは、換言すれば、獲得免疫機構を有しない無脊椎動物である。

10

したがって、前記「自然免疫機構のみを有する生物」としては、無脊椎動物の中から目的に応じて適宜選択することができるが、中でも、昆虫類に属する生物が好ましい。前記「昆虫類」とは、節足動物門大顎亜門の一綱であって、カマアシムシ類、トビムシ類、無翅昆虫類、及び有翅昆虫類の4亜綱からなる綱を意味する。

前記「昆虫類に属する生物」としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、取り扱いの便宜性の点で、幼虫であることが好ましい。前記幼虫としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、鱗翅目（ガやチョウを含む）、甲虫目（カブトムシを含む）の幼虫等が挙げられる。なお、前記幼虫は、前記被検物質の投与のし易さ等の点で、大型の幼虫であることが好ましい。前記「大型の幼虫」とは、体長が1cm以上である幼虫を指す。前記幼虫としては、例えば、カイコ（カイコガ）、エリサンの幼虫等が好ましい。

20

前記自然免疫機構を有する生物としては、後述する工程（b）において被検物質による筋肉の収縮の程度を測定し易い生物を使用することが好ましく、この点でも前記カイコの幼虫は特に好適である。また、前記カイコの幼虫としては、例えば後述する実施例に示すように、カイコ幼虫の断頭筋肉標本を使用することも好ましい。前記カイコ幼虫の断頭筋肉標本を使用すると、中枢からの信号の入力を排除できるという点で有利である。

#### 【0013】

- 被検物質 -

前記「被検物質」としては、特に制限はなく、自然免疫機構を活性化させる作用を有するか否かを評価したい任意の物質を用いることができ、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、微生物抽出物、精製蛋白質、粗精製蛋白質、ペプチド、非ペプチド性化合物、人工的に合成された化合物、天然由来の化合物、既存の自然免疫活性化剤等が挙げられる。

30

#### 【0014】

- 投与 -

前記被検物質の前記自然免疫機構を有する生物への投与方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、経口投与、腹腔内投与、血液中への注射、腸内への注入、飼料（餌）への添加等が挙げられる。

また、前記自然免疫機構を有する生物への前記被検物質の投与量としても、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

40

#### 【0015】

<工程（b）>

前記第1の方法においては、前記被検物質が前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させるか否かを評価する（工程（b））。

前記被検物質が前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させるか否かを評価する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮の程度を *Contraction value* 値（C値）で表すことにより評価することができる（例えば、Sekimizu et al. ; *J. Biochem.* 137, 199-203 (2005) 参照）。具体的には、前記被検物質の投与前、及び投与後の前記自然免疫機構を有する生物の体長を測定し、「投与

50

前の体長」 - 「投与後の体長」を、「投与前の体長」で割り算した値（C値）を求める。筋肉収縮の程度が大きいくほどC値は大きくなり、筋肉収縮が全くなければC値は0となる。また、逆に筋肉が弛緩すればC値は負（マイナス）の値となる。筋収縮の過程を適当な方法、例えば記録計に連結したトランスジューサーを用いてモニターし、筋収縮の程度が最大となったときのC値を測定することが適当である。筋収縮に必要な時間は、投与した前記被検物質の種類や量等に応じて変化するので、適宜選択することが望ましい。

前記C値が正（プラス）の値であるときに、前記被検物質は前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させると評価することができる。また、前記C値が大きいくほど、前記被検物質は前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させる作用が強いと評価することができる。

10

【0016】

前記工程（b）において前記被検物質が前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させると評価された場合に、前記被検物質は自然免疫機構を活性化させる作用を有すると評価することができる。また、前記被検物質の前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させる作用が強いほど、前記被検物質は自然免疫機構を活性化させる作用が強いと評価することができる。

以上、前記工程（a）～工程（b）により、前記第1の評価方法を行うことができる。前記第1の評価方法により、容易に、かつ効率的に前記被検物質が自然免疫機構を活性化させる作用を有するか否かを評価することができる。

【0017】

20

<工程（c）>

また、前記第1のスクリーニング方法においては、更に、前記工程（b）で前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させると評価された物質を選択する（工程（c））。

種々の被検物質を用いて前記工程（a）～工程（b）による評価を行い、次いで、本工程（c）において、種々の被検物質の中から前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させると評価された物質を選択することにより、容易に、かつ効率的に自然免疫機構を活性化させる作用を有する物質をスクリーニングすることができる。

【0018】

（第2の評価方法、第2のスクリーニング方法）

本発明の第2の評価方法は、被検物質が自然免疫機構を抑制する作用を有するか否かを評価する方法であり、以下の工程（a'）～工程（b'）を含み、必要に応じて更にその他の工程を含む。

30

また、本発明の第2のスクリーニング方法は、自然免疫機構を抑制する作用を有する物質をスクリーニングする方法であり、以下の工程（a'）～工程（c'）を含み、必要に応じて更にその他の工程を含む。

以下、前記第2の評価方法及び前記第2のスクリーニング方法を総称して、単に「第2の方法」と称することがある。

【0019】

<工程（a'）>

前記第2の方法においては、自然免疫機構を有する生物に被検物質及び自然免疫活性化物質を投与する（工程（a'））。

40

【0020】

- 自然免疫機構を有する生物 -

前記「自然免疫機構を有する生物」としては、前記した本発明の第1の方法と同様である。

【0021】

- 被検物質 -

前記「被検物質」としては、特に制限はなく、自然免疫機構を抑制する作用を有するか否かを評価したい任意の物質を用いることができ、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、微生物抽出物、精製蛋白質、粗精製蛋

50

白質、ペプチド、非ペプチド性化合物、人工的に合成された化合物、天然由来の化合物、既存の自然免疫抑制剤等が挙げられる。

【 0 0 2 2 】

- 自然免疫活性化物質 -

前記自然免疫活性化物質としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、既存の自然免疫活性化物質を使用することができる。具体的には、例えば、ペプチドグリカン、 グルカン、それらを含む細菌や真菌の死菌等が挙げられる。

前記自然免疫活性化物質としては、前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を誘導できる物質であることが好ましい。前記自然免疫活性化物質により前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を誘導することで、後述する工程 ( b ' ) で被検物質が前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制するか否かを評価することができる。

10

また、前記自然免疫活性化物質としては、前記した本発明の第 1 の方法で、自然免疫機構を活性化させる作用を有すると評価された物質を使用してもよい。

【 0 0 2 3 】

- 投与 -

前記被検物質及び前記自然免疫活性化物質の前記自然免疫機構を有する生物への投与方法としては、前記した本発明の第 1 の方法と同様である。また、前記自然免疫機構を有する生物への前記被検物質及び前記自然免疫活性化物質の投与量としても、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

【 0 0 2 4 】

< 工程 ( b ' ) >

前記第 2 の方法においては、前記被検物質が前記自然免疫活性化物質による前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制するか否かを評価する ( 工程 ( b ' ) ) 。

20

前記被検物質が前記自然免疫活性化物質による前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制するか否かを評価する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、前記した本発明の第 1 の方法と同様に、前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮の程度を *Contraction value* 値 ( C 値 ) で表すことにより評価することができる ( 例えば、*Sekimizura; J. Biochem.* 137, 199 - 203 ( 2005 ) 参照 ) 。前記 C 値の求め方としては、前記した本発明の第 1 の方法と同様である。

30

より具体的には、例えば、前記工程 ( a ' ) で、前記自然免疫機構を有する生物にまず前記被検物質を投与し、次いで前記自然免疫活性化物質を投与し、筋肉の収縮をおこさせる。前記自然免疫機構を有する生物に、前記被検物質及び前記自然免疫活性化物質の両方を投与した際の C 値、及び、前記被検物質を投与せず、前記自然免疫活性化物質のみを投与した際の C 値をそれぞれ求め、前記被検物質及び前記自然免疫活性化物質を投与した際の C 値が、前記自然免疫活性化物質のみを投与した際の C 値に比べて小さい値となった場合に、前記被検物質は前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制すると評価することができる。また、前記被検物質及び前記自然免疫活性化物質を投与した際の C 値と、前記自然免疫活性化物質のみを投与した際の C 値との差が大きいほど、前記被検物質は前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制する作用が強いと評価することができる。

40

【 0 0 2 5 】

前記工程 ( b ' ) において前記被検物質が前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制すると評価された場合に、前記被検物質は自然免疫機構を抑制する作用を有すると評価することができる。また、前記被検物質の前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制する作用が強いほど、前記被検物質は自然免疫機構を抑制する作用が強いと評価することができる。

以上、前記工程 ( a ' ) ~ 工程 ( b ' ) により、前記第 2 の評価方法を行うことができる。前記第 2 の評価方法により、容易に、かつ効率的に前記被検物質が自然免疫機構を抑制する作用を有するか否かを評価することができる。

50

## 【 0 0 2 6 】

< 工程 ( c ' ) >

また、前記第 2 のスクリーニング方法においては、更に、前記工程 ( b ' ) で前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制すると評価された物質を選択する ( 工程 ( c ' ) ) 。

種々の被検物質を用いて前記工程 ( a ' ) ~ 工程 ( b ' ) による評価を行い、次いで、本工程 ( c ' ) において、種々の被検物質の中から前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制すると評価された物質を選択することにより、容易に、かつ効率的に自然免疫機構を抑制する作用を有する物質をスクリーニングすることができる。

## 【 0 0 2 7 】

前記第 1 の方法、前記第 2 の方法はいずれも、自然免疫機構を調節 ( 活性化 / 抑制 ) する作用を有する物質の評価乃至スクリーニングを、カイコ幼虫等の自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を指標として行うことを特徴とする。

ここで、前記第 1 の方法、前記第 2 の方法における自然免疫機構を調節 ( 活性化 / 抑制 ) する作用を有する物質としては、好ましくは、哺乳動物の自然免疫機構を調節 ( 活性化 / 抑制 ) する作用を有する物質であり、より好ましくは、ヒトの自然免疫機構を調節 ( 活性化 / 抑制 ) する作用を有する物質である。前記第 1 の方法、前記第 2 の方法によれば、例えばカイコ幼虫等を用いて、容易に、かつ効率的にヒト等の哺乳動物の自然免疫機構を調節 ( 活性化 / 抑制 ) する作用を有する物質を評価乃至スクリーニングすることが可能となる。

## 【 0 0 2 8 】

前記第 1 の方法、前記第 2 の方法により評価乃至スクリーニングされた自然免疫機構を調節 ( 活性化 / 抑制 ) する作用を有する物質は、例えば、化学合成や、分離精製等の手法により適宜生成することができる。前記物質の使用用途としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、そのまま、又は適宜加工することにより、自然免疫機構の異常による疾患の治療、改善、又は予防に用いることができる。また、後述する本発明の第 1 の薬剤の製造方法 / 第 2 の薬剤の製造方法により製造される薬剤や、第 1 の食品の製造方法 / 第 2 の食品の製造方法により製造される食品、後述する本発明の自然免疫活性化剤や食品に用いることもできる。

## 【 0 0 2 9 】

( 第 1 の薬剤の製造方法、第 1 の食品の製造方法 )

本発明の第 1 の薬剤の製造方法、第 1 の食品の製造方法は、それぞれ自然免疫機構を活性化させるための薬剤、自然免疫機構を活性化させる作用を有する食品の製造方法であり、いずれも以下の工程 ( a ) ~ 工程 ( e ) を含み、必要に応じて更にその他の工程を含む。

## 【 0 0 3 0 】

< 工程 ( a ) ~ 工程 ( c ) >

前記第 1 の薬剤の製造方法、及び第 1 の食品の製造方法における工程 ( a ) ~ 工程 ( c ) は、前記した本発明の第 1 の方法における工程 ( a ) ~ 工程 ( c ) とそれぞれ同様である。前記工程 ( a ) ~ ( c ) により、自然免疫機構を活性化させる作用を有する物質を容易、かつ効率的に選択することができる。

## 【 0 0 3 1 】

< 工程 ( d ) >

前記第 1 の薬剤の製造方法、及び第 1 の食品の製造方法においては、次いで、前記工程 ( a ) ~ ( c ) で選択された、自然免疫機構を活性化させる作用を有する物質を生成する ( 工程 ( d ) ) 。

前記生成の手段としては、特に制限はなく、例えば、前記物質の構造や由来等に応じて、化学合成や、分離精製等の公知の生成手段から適宜選択することができる。

## 【 0 0 3 2 】

< 工程 ( e ) >

前記第1の薬剤の製造方法、及び前記第1の食品の製造方法においては、次いで、前記工程(d)で生成された物質を、薬学的に許容され得る担体、又は食品原料とそれぞれ混合する(工程(e))。

- 薬学的に許容され得る担体 -

前記第1の薬剤の製造方法において、前記薬学的に許容され得る担体としては、特に制限はなく、例えば、製造する薬剤の所望の剤型等に応じて適宜選択することができる。また、前記剤型としても、特に制限はなく、例えば、後述する本発明の自然免疫活性化剤/自然免疫抑制剤の項目で列挙される剤型等が挙げられる。

- 食品原料 -

前記第1の食品の製造方法において、前記食品原料としては、特に制限はなく、例えば、製造する食品の種類等に応じて適宜選択することができる。また、前記食品の種類としても、特に制限はなく、例えば、後述する本発明の食品の項目で列挙される食品等が挙げられる。

【0033】

- 混合 -

前記工程(d)で生成された物質と、前記薬学的に許容され得る担体、又は食品原料との混合方法としては、特に制限はなく、例えば、公知の薬剤の製造方法や公知の食品の製造方法における各成分の混合方法から適宜選択することができる。また、前記混合時の、前記物質と、前記薬学的に許容され得る担体又は食品原料との使用量比としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

【0034】

<その他の工程>

前記その他の工程としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記工程(e)で得られた混合物を成形する成形工程、等が挙げられる。

【0035】

以上、前記工程(a)~工程(e)により、本発明の第1の薬剤の製造方法、及び第1の食品の製造方法を行うことができ、これにより、自然免疫機構を活性化させるための薬剤、及び自然免疫機構を活性化させる作用を有する食品を効率的に製造することができる。前記第1の薬剤の製造方法、及び第1の食品の製造方法により得られた薬剤、及び食品の使用形態としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、後述する本発明の自然免疫活性化剤や本発明の自然免疫活性化作用を有する食品と同様に使用することができる。

【0036】

(第2の薬剤の製造方法、第2の食品の製造方法)

本発明の第2の薬剤の製造方法、第2の食品の製造方法は、それぞれ自然免疫機構を抑制するための薬剤、自然免疫機構を抑制する作用を有する食品の製造方法であり、いずれも以下の工程(a')~工程(e')を含み、必要に応じて更にその他の工程を含む。

【0037】

<工程(a')~工程(c')>

前記第2の薬剤の製造方法、及び第2の食品の製造方法における工程(a')~工程(c')は、前記した本発明の第2の方法における工程(a')~工程(c')とそれぞれ同様である。前記工程(a')~工程(c')により、自然免疫機構を抑制する作用を有する物質を容易、かつ効率的に選択することができる。

【0038】

<工程(d')~工程(e')>

前記第2の薬剤の製造方法、及び第2の食品の製造方法においては、次いで、前記工程(a')~(c')で選択された自然免疫機構を抑制する作用を有する物質を生成する(工程(d'))。更に、前記工程(d')で生成された物質を、薬学的に許容され得る担体、又は食品原料とそれぞれ混合する(工程(e'))。

前記第2の薬剤の製造方法、及び第2の食品の製造方法における工程(d')~工程(e')

10

20

30

40

50

e')は、前記した本発明の第1の薬剤の製造方法、及び第1の食品の製造方法における工程(d)~工程(e)と同様に行うことができる。

【0039】

<その他の工程>

前記その他の工程は、前記した本発明の第1の薬剤の製造方法、及び第1の食品の製造方法と同様に行うことができる。

【0040】

以上、前記工程(a')~工程(e')により、本発明の第2の薬剤の製造方法、及び第2の食品の製造方法を行うことができ、これにより、自然免疫機構を抑制するための薬剤、及び自然免疫機構を抑制する作用を有する食品を効率的に製造することができる。前記第2の薬剤の製造方法、及び第2の食品の製造方法により得られた薬剤、及び食品の使用形態としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、後述する本発明の自然免疫抑制剤や本発明の自然免疫抑制作用を有する食品と同様に使用することができる。

10

【0041】

(自然免疫活性化剤・自然免疫活性化作用を有する食品)

本発明の自然免疫活性化剤や自然免疫活性化作用を有する食品は、自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させる作用を有する物質を含有し、更に必要に応じてその他の成分や原料を含有してなる。また、前記自然免疫活性化剤や自然免疫活性化作用を有する食品は、前記した本発明の第1の薬剤の製造方法、第1の食品の製造方法により製造されたものであってもよい。

20

【0042】

- 自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させる作用を有する物質 -

前記「自然免疫機構を有する生物」としては、前記した本発明の第1の方法と同様である。

前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させる作用を有する物質としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ニンジン、ゴボウ、パクチー、ピーマン、ブロッコリー、ウコン等の野菜の抽出物乃至精製物、納豆のねばねば成分及びその凍結乾燥品、各種漢方薬や生薬の抽出物等が挙げられる。これらの中でも、前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させる作用を有する物質としては、前記ウコンの抽出物乃至精製物が好ましい。前記ウコンの抽出乃至精製の方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、後述する実施例に記載の方法等が好適に挙げられる。なお、前記各種抽出物は、熱水による抽出物であることが好ましい。加圧下での煮沸による抽出物は、特に好ましい態様の一つである。

30

また、前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させる作用を有する物質としては、例えば、前記した本発明の第1の方法で、自然免疫機構を活性化させると評価乃至スクリーニングされた物質を使用することもできる。

【0043】

- 自然免疫活性化剤における態様 -

前記自然免疫活性化剤中の、前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させる作用を有する物質(有効成分)の含有量は、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、また、前記自然免疫活性化剤は、前記有効成分そのものであってもよい。

40

また、前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させる作用を有する物質(有効成分)は、いずれか1種を単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。2種以上を併用する場合の、前記自然免疫活性化剤中の各々の有効成分の含有量比にも、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

【0044】

前記自然免疫活性化剤における、前記その他の成分としては、特に制限はなく、本発明の効果を損なわない範囲内で、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、薬学的に許容され得る担体等が挙げられる。前記担体としても、特に制限はなく、例えば、後述す

50

る前記薬剤の剤型等に応じて適宜選択することができる。また、前記自然免疫活性化剤中の前記その他の成分の含有量としても、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

【0045】

前記自然免疫活性化剤の剤型としては、特に制限はなく、例えば、後述するような所望の投与方法に応じて適宜選択ことができ、例えば、経口固形剤（錠剤、被覆錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等）、経口液剤（内服液剤、シロップ剤、エリキシル剤等）、注射剤（溶液、懸濁液、用事溶解用固形剤等）、軟膏剤、貼付剤、ゲル剤、クリーム剤、外用散剤、スプレー剤、吸入散剤等が挙げられる。

【0046】

前記経口固形剤としては、例えば、前記有効成分に、賦形剤、更には必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味・矯臭剤等の添加剤を加え、常法により製造することができる。

前記賦形剤としては、例えば、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、微結晶セルロース、珪酸等が挙げられる。前記結合剤としては、例えば、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン液、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、メチルセルロース、エチルセルロース、シェラック、リン酸カルシウム、ポリビニルピロリドン等が挙げられる。前記崩壊剤としては、例えば、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、乳糖等が挙げられる。前記滑沢剤としては、例えば、精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ砂、ポリエチレングリコール等が挙げられる。前記着色剤としては、例えば、酸化チタン、酸化鉄等が挙げられる。前記矯味・矯臭剤としては、例えば、白糖、橙皮、クエン酸、酒石酸等が挙げられる。

【0047】

前記経口液剤としては、例えば、前記有効成分に、矯味・矯臭剤、緩衝剤、安定化剤等の添加剤を加え、常法により製造することができる。

前記矯味・矯臭剤としては、例えば、白糖、橙皮、クエン酸、酒石酸等が挙げられる。前記緩衝剤としては、例えば、クエン酸ナトリウム等が挙げられる。前記安定化剤としては、例えば、トラガント、アラビアゴム、ゼラチン等が挙げられる。

【0048】

前記注射剤としては、例えば、前記有効成分に、pH調節剤、緩衝剤、安定化剤、等張化剤、局所麻酔剤等を添加し、常法により皮下用、筋肉内用、静脈内用等の注射剤を製造することができる。

前記pH調節剤及び前記緩衝剤としては、例えば、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム等が挙げられる。前記安定化剤としては、例えば、ピロ亜硫酸ナトリウム、EDTA、チオグリコール酸、チオ乳酸等が挙げられる。前記等張化剤としては、例えば、塩化ナトリウム、ブドウ糖等が挙げられる。前記局所麻酔剤としては、例えば、塩酸プロカイン、塩酸リドカイン等が挙げられる。

【0049】

前記軟膏剤としては、例えば、前記有効成分に、公知の基剤、安定剤、湿潤剤、保存剤等を配合し、常法により混合し、製造することができる。

前記基剤としては、例えば、流動パラフィン、白色ワセリン、サラシミツロウ、オクチルドデシルアルコール、パラフィン等が挙げられる。前記保存剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル等が挙げられる。

【0050】

前記貼付剤としては、例えば、公知の支持体に前記軟膏剤としてのクリーム剤、ゲル剤、ペースト剤等を、常法により塗布し、製造することができる。前記支持体としては、例えば、綿、スフ、化学繊維からなる織布、不織布、軟質塩化ビニル、ポリエチレン、ポリ

10

20

30

40

50

ウレタン等のフィルム、発泡体シート等が挙げられる。

【 0 0 5 1 】

前記自然免疫活性化剤は、例えば、自然免疫機構の活性化を必要とする個体（例えば、健康維持や疲労回復を必要とする個体、癌や生活習慣病の予防乃至治療を必要とする個体、細菌や真菌、ウイルス等に感染した個体等）に投与することにより使用することができる。

前記自然免疫活性化剤の投与対象動物としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ、サル等が挙げられる。

また、前記自然免疫活性化剤の投与方法としては、特に制限はなく、例えば、前記自然免疫活性化剤の剤型等に応じ、適宜選択することができる。経口投与、腹腔内投与、血液中への注射、腸内への注入等が挙げられる。

また、前記自然免疫活性化剤の投与量としては、特に制限はなく、投与対象である患者の年齢、体重、所望の効果の程度等に応じて適宜選択することができるが、例えば、成人への1日の投与あたり、有効成分の量として、1 mg ~ 10 g が好ましく、10 mg ~ 1 g がより好ましい。

また、前記自然免疫活性化剤の投与時期としても、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、予防的に投与されてもよいし、治療的に投与されてもよい。

【 0 0 5 2 】

- 自然免疫活性化作用を有する食品における態様 -

前記自然免疫活性化作用を有する食品中の、前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させる作用を有する物質の含有量は、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。また、前記自然免疫活性化作用を有する食品は、前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させる作用を有する物質そのものであってもよい。

また、前記自然免疫機構を有する生物の筋肉を収縮させる作用を有する物質は、いずれか1種を単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。2種以上を併用する場合の、前記食品中の各々の物質の含有量比にも、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

【 0 0 5 3 】

前記自然免疫活性化作用を有する食品における、前記その他の成分としては、特に制限はなく、本発明の効果を損なわない範囲内で目的に応じて適宜選択することができる。例えば、各種食品原料等が挙げられる。

前記食品の種類としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、ゼリー、キャンディー、チョコレート、ビスケット等の菓子類；緑茶、紅茶、コーヒー、清涼飲料等の嗜好飲料；原料乳、ヨーグルト、アイスクリーム等の乳製品；野菜飲料、果実飲料、ジャム類等の野菜・果実加工品；スープ等の液体食品；パン類、麺類等の穀物加工品；各種調味料；等が挙げられる。これらの食品の製造方法としては、特に制限はなく、例えば、通常の各種食品の製造方法に応じて、適宜製造することができる。

また、前記食品は、例えば、錠剤、顆粒剤、カプセル剤等の経口固形剤や、内服液剤、シロップ剤等の経口液剤として製造されたものであってもよい。前記経口固形剤、経口液剤の製造方法は、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、前記した薬剤の経口固形剤、経口液剤の製造方法にならぬ、製造することができる。

前記食品は、自然免疫機構の活性化を目的とした、機能性食品、健康食品等として、特に有用であると考えられる。

また、前記食品中の前記その他の成分の含有量としても、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

【 0 0 5 4 】

( 自然免疫抑制剤・自然免疫抑制作用を有する食品 )

本発明の自然免疫抑制剤や自然免疫抑制作用を有する食品は、自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制する作用を有する物質を含有し、更に必要に応じてその他の成分を

10

20

30

40

50

含有してなる。また、前記自然免疫抑制剤や自然免疫抑制作用を有する食品は、前記した本発明の第2の薬剤の製造方法、第2の食品の製造方法により製造されたものであってもよい。

【0055】

- 自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制する作用を有する物質 -

前記「自然免疫機構を有する生物」としては、前記した本発明の第1の方法と同様である。

前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制する作用を有する物質としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記した本発明の第2の方法で、自然免疫機構を抑制すると評価乃至スクリーニングされた物質を使用することができる。

10

【0056】

- 自然免疫抑制剤における態様 -

前記自然免疫抑制剤中の、前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制する作用を有する物質（有効成分）の含有量は、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、また、前記自然免疫抑制剤は、前記有効成分そのものであってもよい。

また、前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制する作用を有する物質（有効成分）は、いずれか1種を単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。2種以上を併用する場合の、前記自然免疫抑制剤中の各々の有効成分の含有量比にも、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

20

【0057】

前記自然免疫抑制剤における、前記その他の成分としては、前記した本発明の自然免疫活性化剤におけるその他の成分と同様である。前記自然免疫抑制剤の剤型としては、前記した本発明の自然免疫活性化剤における剤型と同様である。

【0058】

前記自然免疫抑制剤は、例えば、自然免疫機構の抑制を必要とする個体（例えば、移植臓器に対する拒絶反応を防ぐ必要のある個体、自己免疫疾患を予防乃至治療する必要のある個体、細菌や真菌による感染により自然免疫が異常に亢進している個体等）に投与することにより使用することができる。

前記自然免疫抑制剤の投与対象動物としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ、サル等が挙げられる。

30

また、前記自然免疫抑制剤の投与方法としては、特に制限はなく、例えば、前記薬剤の剤型等に応じ、適宜選択することができ、経口投与、腹腔内投与、血液中への注射、腸内への注入等が挙げられる。

また、前記自然免疫抑制剤の投与量としては、特に制限はなく、投与対象である患者の年齢、体重、所望の効果の程度等に応じて適宜選択することができるが、例えば、成人への1日の投与あたり、有効成分の量として、1mg～10gが好ましく、10mg～1gがより好ましい。

また、前記自然免疫抑制剤の投与時期としても、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、予防的に投与されてもよいし、治療的に投与されてもよい。

40

【0059】

- 自然免疫抑制作用を有する食品における態様 -

前記自然免疫抑制作用を有する食品中の、前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制する作用を有する物質の含有量は、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、また、前記自然免疫抑制作用を有する食品は、前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制する作用を有する物質そのものであってもよい。

また、前記自然免疫機構を有する生物の筋肉の収縮を抑制する作用を有する物質は、いずれか1種を単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。2種以上を併用する場合の、前記食品中の各々の物質の含有量比にも、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

50

## 【0060】

前記自然免疫抑制作用を有する食品における、前記その他の成分としては、前記した本発明の自然免疫活性化作用を有する食品におけるその他の成分と同様である。

前記自然免疫抑制作用を有する食品の種類としては、前記した本発明の自然免疫活性化作用を有する食品の種類と同様である。

前記食品は、自然免疫機構の抑制を目的とした、機能性食品、健康食品等として、特に有用であると考えられる。

## 【実施例】

## 【0061】

以下に本発明の実施例について説明するが、本発明は、これらの実施例に何ら限定されるものではない。

## 【0062】

(実施例1：ペプチドグリカン、 グルカンによるカイコ幼虫の筋肉収縮)

細菌由来のペプチドグリカンや、キノコ由来の グルカンが自然免疫系(自然免疫機構)を活性化作用を有することは既に知られている(例えば、安達、大野「真菌多糖の免疫系による認識とその活性化作用」Jpn. J. Med. Mycol. 47, 185-194(2006)及びAkira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. Cell 124, 783-801(2006)参照)。本実施例では、これらの自然免疫活性化物質がカイコ幼虫の筋肉収縮に与える影響を調べた。

## 【0063】

<方法>

黄色ブドウ球菌由来のペプチドグリカン(シグマ社)又はキノコ由来の グルカン(本実施例においては、アガリクスキノコの熱水抽出物を用いた)を0.9%NaClに懸濁し、0.05mLを、カイコ幼虫の断頭筋肉標本(Sekimizu et al.; J. Biochem. 137, 199-203(2005)参照)の体腔内に、1mLの使い捨て注射筒(テルモ社)を用いて注射し、収縮が最高値を示した時点(およそ10分後)の注射後の体長を測定した。

カイコ幼虫の筋肉収縮の程度を、Contraction value値(C値)により評価した(Sekimizu et al.; J. Biochem. 137, 199-203(2005)参照)。ここで、C値とは、「注射前の体長(cm)」-「注射後の体長(cm)」を、「注射前の体長(cm)」で割り算した値である。筋肉収縮の程度が大きいほどC値も大きくなり、筋肉収縮が全くなければこの値は0となる。また、逆に弛緩すればマイナスの値となる。生理食塩水(0.9%NaCl)の注射による値は0であった。なお、通常の実験条件下では、最も筋肉が収縮した場合、C値は0.4となる。

## 【0064】

また、予め0.9%NaClに溶解したLグルタミン酸(40mM)溶液0.05mLをカイコ幼虫の断頭筋肉標本に注射した後、直ちに0.5mg/mL又は5mg/mLの黄色ブドウ球菌由来のペプチドグリカン懸濁液0.05mLを注射して、収縮が最高値を示した時点(およそ10分後)の体長を測定し、C値を算出した。また、ペプチドグリカンの代わりにカイニン酸(0.2mM)を用いた実験を対照実験として実施した。カイニン酸は、グルタミン酸受容体アゴニストであり、グルタミン受容体に強く結合して神経を過剰に興奮させることにより、筋肉収縮を誘導することが知られている。また、このカイニン酸による筋肉の収縮はLグルタミン酸により阻害されることが既に知られている。

## 【0065】

<結果>

結果を図1~2に示す。

カイコ幼虫の断頭筋肉標本に自然免疫活性化物質(黄色ブドウ球菌由来のペプチドグリカン、又はキノコ由来の グルカン)を各用量で注射した結果、いずれの物質も筋肉収縮を誘導した(図1)。なお、カイニン酸の場合、最大筋肉収縮の2分の1の収縮を与える

10

20

30

40

50

時間 ( $t_{1/2}$  値) が 2 秒以内であるのに対し、ペプチドグリカンや グルカンの場合の  $t_{1/2}$  値は 2 分以上であった。更に、カイニン酸によるカイコ幼虫の筋肉収縮は L グルタミン酸により阻害されるが、ペプチドグリカンや グルカンによるカイコ幼虫の筋肉収縮は L グルタミン酸により阻害されなかった (図 2)。

#### 【 0 0 6 6 】

本実施例の結果から、ペプチドグリカン、 グルカン等の自然免疫活性化物質が、カイコ幼虫の筋肉収縮を誘導する作用を有していることが示された。このことは、カイコ幼虫等の自然免疫機構を有する生物において、自然免疫機構と筋肉収縮機構とが関連して機能していることを示唆するものである。

また、一般に、筋肉の収縮は、D グルタミン酸やカイニン酸 (グルタミン酸受容体アゴニスト) 等の神経伝達物質による神経の興奮により誘導されることが知られているが、このような神経伝達物質を介した筋肉の収縮は L グルタミン酸により阻害されることが知られている。これに対して、本実施例の結果から、ペプチドグリカン、 グルカン等の自然免疫活性化物質による筋肉収縮は L グルタミン酸によっては阻害されないことが示された。このことから、これらの自然免疫活性化物質は、D グルタミン酸やカイニン酸等とは異なる経路を介して筋肉収縮を誘導しているメカニズムが考えられる。

#### 【 0 0 6 7 】

(実施例 2 : カイコ麻痺ペプチド B m P P によるカイコ幼虫の筋肉収縮)

カイコ幼虫の体液を取り出して、更にもう一度カイコ幼虫に注射すると、カイコ幼虫が麻痺することが知られている。この麻痺物質は、24 個のアミノ酸残基からなる B m P P と呼ばれるペプチドである (H a r a ; P e p t i d e s , 2 0 , 5 6 1 - 5 6 8 ( 1 9 9 9 ) 参照)。本実施例では、このペプチドの合成品をカイコ幼虫の断頭筋肉標本に注射して、反応を調べた。

#### 【 0 0 6 8 】

< 方法 >

種々の濃度の B m P P (農業生物資源研究所の神村学博士から提供された) を 0 . 9 % N a C l に溶解し、0 . 0 5 m L をカイコ幼虫の断頭筋肉標本の体腔内に注射し、6 分後に体長を測定し、実施例 1 と同様にして C 値を算出した。

また、予め 0 . 9 % N a C l に溶解した L グルタミン酸 (4 0 m M ) 溶液 0 . 0 5 m L を注射した後、直ちに B m P P を注射し、収縮が最高値を示した時点 (およそ 1 0 分後) の体長を測定し、C 値を算出した。B m P P の代わりにカイニン酸 (0 . 2 m M ) を用いた実験を対照実験として実施した。

#### 【 0 0 6 9 】

< 結果 >

結果を図 3 ~ 4 に示す。

カイコ幼虫の断頭筋肉標本に B m P P を注射した結果、1 0 n g の B m P P が筋肉収縮を引き起こすことが分かった (図 3)。この量の B m P P を生きたカイコ幼虫に注射すると麻痺を引き起こす。したがって、カイコ幼虫の麻痺は、筋肉の収縮によっていると考えられる。

B m P P による筋肉収縮の  $t_{1/2}$  値は 2 分以上であり、カイニン酸よりも遅い反応である。また、B m P P による筋肉の収縮は、L グルタミン酸により阻害されなかった (図 4)。カイニン酸による筋肉の収縮は L グルタミン酸により阻害されることから、これらの結果は、B m P P による筋肉の収縮が、カイニン酸とは異なる経路によっていることを強く示唆するものである。

#### 【 0 0 7 0 】

(実施例 3 : ペプチドグリカンによる筋肉収縮の抗 B m P P 抗体による阻害)

B m P P による筋肉の収縮は、B m P P に対する抗体により阻害される。同様な条件下で、ペプチドグリカンによる筋肉の収縮が抗 B m P P 抗体により阻害されるか否かを検討した。

#### 【 0 0 7 1 】

## &lt; 方法 &gt;

BmPPに対するウサギ抗血清0.05mLをカイコ幼虫の断頭筋肉標本の体腔内に注射した後、直ちに、0.4μg/mLのBmPP液、或いはペプチドグリカン（本実施例においては、黄色ブドウ球菌をオートクレーブ処理したものをを用いた）の懸濁液0.05mLを注射し、収縮が最高値を示した時点（およそ10分後）の体長を測定し、実施例1と同様にしてC値を算出した。BmPPに対するウサギ抗血清の代わりに0.9%NaClを注射し、対照実験とした。

## 【0072】

## &lt; 結果 &gt;

結果を図5に示す。

抗BmPP抗体により、ペプチドグリカンによるカイコ幼虫の筋肉収縮は阻害されることが分かった（図5）。この結果は、ペプチドグリカンによる筋肉の収縮において、BmPPが必要であることを示唆している。BmPP自体が筋肉収縮を引き起こすという結果と合わせると、ペプチドグリカンは、カイコ幼虫の体液内に存在するBmPPの前駆体を活性化体へと変化させることにより、筋肉収縮を引き起こしていると考えられる。

以上より、自然免疫活性化物質として知られるペプチドグリカンが筋肉収縮を引き起こす機序が判明したことにより、筋肉を収縮させるか否か（又はその程度）を評価すれば自然免疫活性化作用の有無（又はその程度）を評価できることが明らかになった。

## 【0073】

（実施例4：ラジカルスカベンジャーによる筋肉収縮の阻害）

BmPPの活性化は、空気中の酸素によって引き起こされることが知られている（例えば、Kamimura M. et al.; Molecular cloning of silkworm paralytic peptide and its developmental regulation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 286, 67-73 (2001) 参照）。カイコ幼虫の断頭筋肉標本で引き起こされるペプチドグリカンによるBmPPの活性化は、免疫担当細胞或いは体液中に存在するペプチドグリカンの受容体タンパク質にペプチドグリカンが結合し、その結果として誘導される活性酸素種によるものである可能性がある。

活性酸素種の減少は、BmPPの活性化を阻害し、筋肉収縮が起こり難くなる可能性がある。この点を検討するために、本発明者らは、活性酸素の作用を阻害するラジカルスカベンジャーの、ペプチドグリカンによる筋肉収縮に対する阻害効果を検討した。

## 【0074】

## &lt; 方法 &gt;

カイコ幼虫の断頭筋肉標本の体腔内に、ラジカルスカベンジャーとして知られるN-アセチルシステイン（200mM）を0.05mL注射後、空気0.05mL、ペプチドグリカン（本実施例においては、黄色ブドウ球菌をオートクレーブ処理したものをを用いた）、125mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、0.2mMカイニン酸、或いは0.4μg/mL BmPPの0.9%NaCl溶液（或いは懸濁液）0.05mLを注射し、収縮が最高値を示した時点（およそ10分後）の体長を測定し、実施例1と同様にしてC値を算出した。

## 【0075】

## &lt; 結果 &gt;

結果を図6に示す。

ラジカルスカベンジャーとして知られるN-アセチルシステインは、空気、ペプチドグリカン、或いはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による筋肉収縮を阻害することが分かった（図6）。カイニン酸やBmPPによる筋肉収縮に対しては、N-アセチルシステインは阻害効果を示さなかった。

これらの結果から、前記したように、免疫担当細胞或いは体液中に存在するペプチドグリカンの受容体タンパク質にペプチドグリカンが結合することにより、活性酸素種が誘導され、この活性酸素種によりBmPPが活性化された結果、カイコ幼虫の筋肉収縮が導かれるというメカニズムが示唆された。

10

20

30

40

50

また、この結果は、カイコ幼虫の筋肉収縮を抑制するか否かを指標として、自然免疫機構を抑制する物質を探索できることを強く示唆している。

【0076】

(実施例5：LPSのカイコ幼虫の筋肉収縮に対する影響)

自然免疫系に対する促進物質として、グラム陰性細菌由来のリポポリサッカライド(LPS)が知られている(例えば、Immunology, 第5版, Janeway et al. (2001) Garland Publishing 参照)。一般にLPSの作用は、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下でみられるとされている。本発明者らは、種々の細菌由来のLPSについて、カイコ幼虫の断頭筋肉標本における筋肉収縮作用を検討した。

【0077】

<方法>

種々の細菌由来のLPS(シグマ社)をカイコ幼虫の断頭筋肉標本の体腔内に注射し、6分後に体長を測定し、実施例1と同様にしてC値を算出した。更に空気 $0.2\text{mL}$ を注射し、標本の筋肉収縮能が失われていないかを確認した。

【0078】

<結果>

結果を図7に示す。

大腸菌*Escherichia coli*、コレラ菌*Vibrio cholerae*、緑膿菌*Pseudomonas aeruginosa*、クレブシエラ菌(肺炎桿菌)*Klebsiella pneumoniae*、及び赤痢菌*Shigella flexneri*由来のLPS(いずれもシグマ社)は、 $1.3\mu\text{g}$ 及び $12.5\mu\text{g}$ ( $4\text{g}$ のカイコ幼虫に対して)では、全く筋肉収縮作用を示さなかった(図7)。

また、空気 $0.2\text{mL}$ の注射によってC値が $0.25\sim 0.33$ となったことにより、筋肉収縮能があることが明らかになった。

カイコ幼虫にLPSを注射すると、脂肪体の細胞において抗菌タンパク質が誘導されることが報告されている。したがって、カイコ幼虫の自然免疫系は潜在的にはLPSに反応する能力を備えていると思われる。しかしながら、一方では、カイコ幼虫の体液中にLPSと結合して複合体を形成するタンパク質の存在が報告されている。カイコ幼虫個体では、このタンパク質がLPSを吸収してしまうので、見かけ上筋肉収縮が起こらないものと考えられる。

【0079】

(実施例6：野菜抽出物による筋肉収縮、及び抗ウイルス作用)

食品として利用される野菜の熱水抽出物について、カイコ幼虫の筋肉収縮活性を調べ、これにより自然免疫活性化作用を有するか否かを評価した。また、その自然免疫活性化作用を確認した。

【0080】

<方法>

それぞれの野菜(ニンジン、ゴボウ、パクチー、ピーマン、ブロッコリー、パセリ、カボチャ、ネギ(根)、キウリ、菜の花、ショウガ、ホウレンソウ、ニンニク、ダイコン、トウビョウ、キャベツ)を凍結乾燥し、乳鉢で粉碎した後、各サンプル $1\text{g}$ に対して $5\text{mL}$ の蒸留水を加え、 $8,000\text{rpm}$ 、5分の遠心を施した。沈殿に蒸留水 $3\text{mL}$ を加え、オートクレーブ器を用いて、 $121$ にて20分加熱処理した。これを室温にて $8,000\text{rpm}$ 、10分の遠心により上清を得て、熱水抽出物とした。熱水抽出物サンプルを、希釈率 $0.001\sim 1$ 質量%となるように $0.9\% \text{NaCl}$ で希釈し、 $0.05\text{mL}$ をカイコ幼虫の断頭筋肉標本の体腔内に注射し、6分後に体長を測定し、実施例1と同様にしてC値を算出した。ここで「希釈率」とは、 $0.9\% \text{NaCl}$ 水溶液で希釈した液全体に対する上記熱水抽出物サンプルの質量%である。また、5種の野菜熱水抽出物を等量ずつ混和し、「mixture」として用いた。

【0081】

また、カイコ幼虫の体液にバキュロウイルスを注射後、ニンジンの熱水抽出物 $0.05$

10

20

30

40

50

mLを体液注射した。対照として、バキュロウイルスのみ、或いはバキュロウイルスの代わりに0.9%NaClのみを注射した。

【0082】

<結果>

結果を図8～9に示す。

ニンジン、ゴボウ、パクチー、ピーマン、ブロッコリーの熱水抽出物は、いずれもカイコ幼虫の筋肉収縮活性を示した(図8参照)。また、図には示さなかったが、パセリ、カボチャ、ネギ(根)、キウリ、菜の花の熱水抽出物も、全てカイコ幼虫の筋肉収縮活性を示した。また、5種の野菜熱水抽出物を混和して「mixture」とした場合にも、筋肉収縮活性は失われることなく、明瞭に観察された(図8参照)。

10

一方、ショウガ、ハウレンソウ、ニンニク、ダイコン、トウビョウ、キャベツは、何れの希釈率でもカイコ幼虫の筋肉収縮を引き起こさなかった(図示せず)。したがって、本発明におけるカイコ幼虫の筋肉収縮活性を指標とする自然免疫活性化物質のスクリーニング方法は、例えば野菜等の植物に含まれる自然免疫活性化物質の検出に有効であると考えられる。

更に本発明者らは、カイコ幼虫の筋肉収縮活性を示したニンジンの熱水抽出物にウイルス感染を治療する活性があることを見出した(図9)。バキュロウイルスのみを感染させた群では、115時間後には全数のカイコ幼虫が死亡したが、ニンジン抽出物注射群では、6割のカイコ幼虫が生存していた。

よって、ニンジンの熱水抽出物中に、自然免疫系を活性化して、ウイルスに対する抵抗力を増強させる物質が存在していることが示唆されたことにより、カイコ幼虫の筋肉収縮活性を示すものは、自然免疫系を活性化することが認められた。

20

【0083】

(実施例7：ウコン粉末からの自然免疫活性化物質の精製)

ウコンは健康食品として広く一般に販売されている。その中でも自然免疫系を活性化させる作用を有する成分を得るため、カイコ幼虫の筋肉収縮を指標としてウコン粉末の精製を行った。

【0084】

<方法>

ウコン粉末12gを180mLの蒸留水に懸濁し、121℃で20分間、オートクレーブ処理した。室温にて8,000rpm、25分の遠心後、上清を集め、分量のエチルアルコール(終濃度33%)を加え、生じた沈殿を遠心により除去した。更に終濃度67%となるようエチルアルコールを加え、氷上で30分間冷却した後、生じた沈殿を遠心により集め、50mM Tris-HCl(pH7.9)に溶解し、DEAEセルロースカラム(40mL)にかけた。カラムに吸着した物質を、総量200mLの0から1MのNaClのグラジェントにより溶出させた。各フラクションの体積は、1.5mLである。また、各々の画分によるカイコ幼虫の筋肉収縮活性を調べた。各々の画分0.05mLをカイコ幼虫の断頭筋肉標本の体腔内に注射し、収縮が最高値を示した時点(およそ10分後)の体長を測定し、実施例1と同様にしてC値を算出した。

30

【0085】

<結果>

結果を図10に示す。

本発明者らは、ウコンの熱水抽出物中に、カイコ幼虫の断頭筋肉標本における筋肉の収縮を誘導する物質が含まれていることを見出した。この活性成分は、33%エチルアルコールの上清、67%エチルアルコールの沈殿画分に回収された。この画分を更にDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーにかけたところ、活性成分はカラムに吸着し、NaClのグラジェント溶出により、単一のピークとして溶出された(図10)。この結果は、活性成分が比較的均一の弱酸性物質であることを示唆している。

40

【0086】

(実施例8：ウコン粉末から精製された物質の、マウスマクロファージに対する活性化作

50

用)

実施例7で、「カイコ幼虫の筋肉収縮活性を示すウコン粉末から精製された物質」が、哺乳動物の自然免疫系を活性化することを以下のようにして確認した。

【0087】

<方法>

1 × 10<sup>6</sup> / mL のマウス腹腔マクロファージ懸濁液 0.1 mL を 96 穴プレートに注し、ウコンの熱水抽出物或いは D E A E セルロース精製画分を加えて 2 日間インキュベーションした後、上清の I L - 6 量を E L I S A 法により定量した。

【0088】

<結果>

結果を図11に示す。なお、図11中の横軸の数値は、C値が0.15となる筋肉収縮活性を1単位と定義した場合の、各サンプルのカイコ幼虫断頭標本における活性単位を示す。すなわち、横軸の数字は、カイコの筋肉収縮を指標とした自然免疫活性化活性を示している。カイコの筋肉を15%収縮させる活性が1ユニットである。熱水抽出及び D E A E 溶出画分については、それぞれを生理食塩水で2倍ずつ希釈して反応系に加えた。

マウス腹腔マクロファージに対して、ウコン粉末の熱水抽出物及び D E A E セルロースカラムクロマトグラフィーによる精製画分について調べたところ、いずれも I L - 6 の放出を促進することが判明した。またこの I L - 6 放出活性の強さは、カイコ幼虫における筋肉収縮活性の強さと対応していた(図11)。したがって、両活性は同一の物質によるものと考えられる。

この結果は、カイコ幼虫の筋肉収縮を指標として、哺乳動物の自然免疫活性化物質を評価、スクリーニング(探索)できることを強く示唆している。既に、昆虫と哺乳動物の自然免疫系には共通した機構が存在することが知られており、この事実も、本発明における前記結論の合理性を主張するものである。

【0089】

(効果/用途)

前記した各実施例の結果から、本発明者らは、カイコ幼虫における自然免疫系の活性化に筋肉収縮系の活性化が伴うこと、即ち、両システムがカップルしているという従来には全く無かった新しいコンセプトを得るに至った。

また、カイコ幼虫の体液中に存在するペプチド B m P P がカイコ幼虫の麻痺を起こすことは既に知られていたが、本発明者らは更に、B m P P がカイコ幼虫の筋肉を収縮させることを初めて明らかにした(実施例2)。

更に、本発明者らは、自然免疫機構を活性化させることが知られているペプチドグリカンが筋肉収縮を引き起こすこと(実施例1)、並びに、B m P P に対する抗体がこの筋肉収縮を阻害すること(実施例3)を明らかにした。したがって、ペプチドグリカンによる筋肉収縮は、B m P P を介していることが明らかとなった。

また、ペプチドグリカンによる筋肉収縮は、ラジカルスカベンジャーにより阻害された(実施例4)。これらの結果に対する合理的な説明は、ペプチドグリカンによる自然免疫系の活性化に伴う活性酸素種の血液内での濃度上昇により、B m P P の活性化が引き起こされ、それにより筋肉の収縮が起こるといものである。即ち、自然免疫系と筋肉収縮系はカップルしていることになる。そして、自然免疫系と筋肉収縮系に相関がある必然性が明らかになったことにより、筋肉収縮活性を評価することによって、自然免疫系を活性化の評価ができることが明確になった。

【0090】

前記した各実施例の結果から示唆される自然免疫系と筋肉収縮系との関連を、図12に示す。ペプチドグリカンや グルカンは、免疫担当細胞(或いは体液性)の受容体に結合し、結果として活性酸素種(R O S)が産生される。それがプロテアーゼのカスケードを促進し、カイコ幼虫の麻痺ペプチド B m P P の前駆体(不活性型)から活性化体への変化をもたらす。活性化された B m P P は、直接(或いは間接)に筋肉細胞に作用し、筋肉の収縮を促す。この経路は、数分かかること、並びに、L グルタミン酸による抑制効果を受

10

20

30

40

50

けない点で、カイニン酸による神経の興奮を介した筋肉収縮経路とは異なっている（実施例 1～2）。

【0091】

この考えに基づけば、カイコ幼虫等の自然免疫機構を有する生物の筋肉収縮を指標に、新たな自然免疫活性化物質をスクリーニング（探索）することが可能である。実際に本発明では、ニンジンやウコン等の野菜を使った実施例を示し、これらの野菜に含まれる成分がカイコ幼虫のバキュロウイルス感染に対して治療効果を奏すること、並びにマウスのマクロファージを活性化することを示した（実施例 6～8）。本発明を利用して、様々な天然物から新たな自然免疫活性化物質を発見し、ヒトの様々な疾病の予防乃至治療に役立てることが可能であると期待される。

10

【0092】

また、従来は、自然免疫活性化物質を探索する場合には、培養したマクロファージ等の免疫担当細胞に被検物質を加え、IL-6やTNF-等のサイトカインの放出をELISA等により検出するという方法がとられてきたが、このような従来の方法では、細胞培養を行うための設備が必要であり、また、探索された物質を個体に投与した場合、体内動態に問題がある物質でも探索されてしまうという問題があった。また、被検物質にわずかに混入した細菌由来のリポポリサッカライド（LPS）が反応してしまい、多くの被検物質が擬陽性を示し、新規物質を探索する上での障害となっていた。

これに対して、本発明のカイコ幼虫等の筋肉収縮を指標としたスクリーニング方法では、細胞培養設備が不要であり、極めて簡便に自然免疫活性化物質の探索を行うことが可能となる。また、カイコ幼虫等の個体に対して被検物質を投与するので、体内動態に問題がある物質は排除することができる。また、カイコ幼虫では、実施例で使用した濃度の細菌由来のLPSに対して筋肉収縮が起こらないことから（実施例 5）、被検物質に混入した細菌由来のLPSによる擬陽性の問題を解消することが可能となる。

20

【0093】

本発明によれば、新たな自然免疫活性化物質を探索することが可能となるのに加え、既存の自然食品や漢方薬等、効能に対する機構が未解明な天然物から、薬効を示す化合物を精製することも可能となる。

また、本発明は特に、前記したような従来培養細胞を用いた自然免疫活性化物質の探索方法と組み合わせることで、新たな自然免疫活性化物質の探索を効率的に行うことができるようになると考えられる。本発明により評価、探索された自然免疫活性化物質は、例えば健康維持、疲労回復、癌の予防乃至治療等、様々な用途に好適である。

30

また、本発明は、自然免疫活性化物質ばかりでなく、自然免疫抑制物質の評価、探索にも好適に用いられる。本発明により評価、探索された自然免疫抑制物質は、例えば免疫抑制剤や抗炎症剤として、様々な用途に好適である。

【産業上の利用可能性】

【0094】

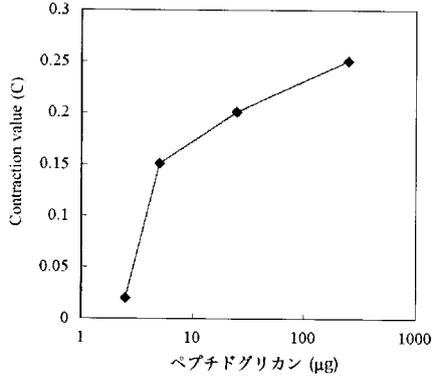
本発明の評価方法及びスクリーニング方法、並びに、薬剤、食品及びそれらの製造方法は、自然免疫機構を活性化/抑制する作用を有する物質の評価乃至スクリーニングに非常に有用であり、また、これらを利用した自然免疫活性化剤・自然免疫活性化作用を有する食品/自然免疫抑制剤・自然免疫抑制作用を有する食品の開発に非常に有用である。

40

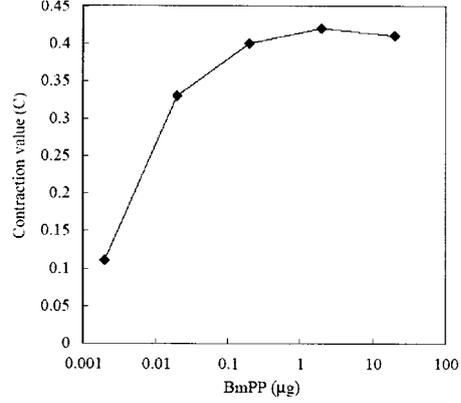
【0095】

本願は、2007年4月10日に申請した日本の特許出願である特願2007-102918に基づくものであり、それらの出願の全ての内容はここに引用し、本発明の明細書の開示として取り込まれるものである。

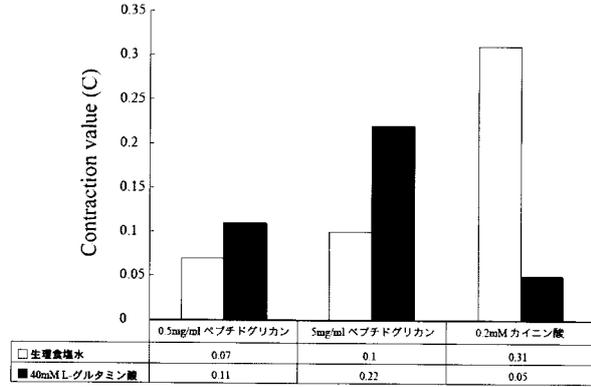
【図1】



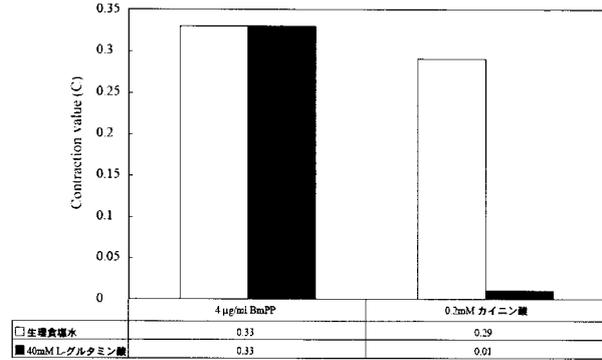
【図3】



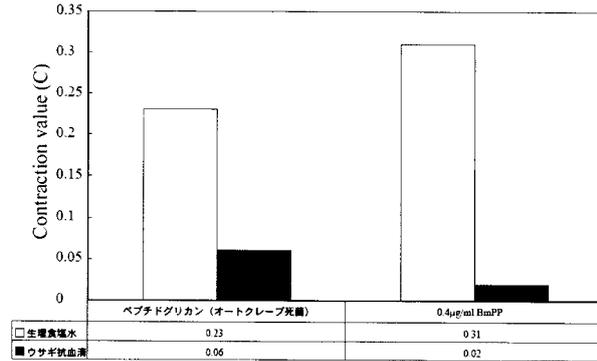
【図2】



【図4】



【図5】

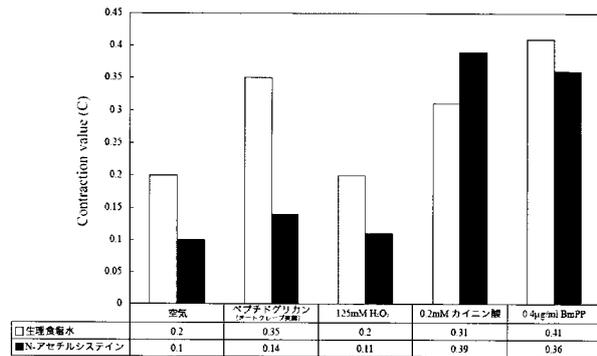


【図7】

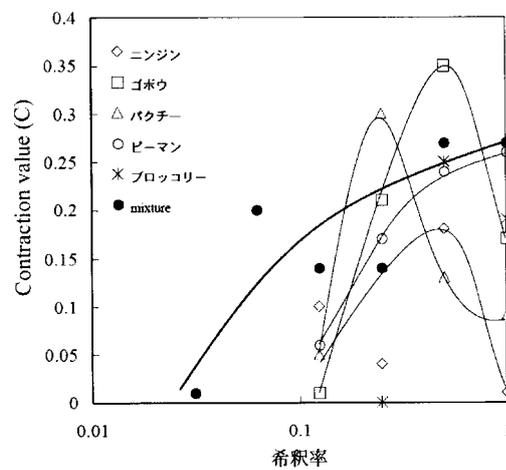
LPS由来	LPS		空気	
	注射量(μg)	収縮値(C)	注射量(mL)	収縮値(C)
生理食塩水	0	0	0.2	0.31
大腸菌	12.5	0	0.2	0.31
	1.3	-0.04	0.2	0.25
コレラ (Inaba 569B)	12.5	-0.01	0.2	0.29
緑膿菌 (10(Habs))	12.5	-0.03	0.2	0.29
肺炎桿菌	12.5	0	0.2	0.33
新血清型赤痢菌 (1A)	12.5	-0.01	0.2	0.28

括弧内は血清型

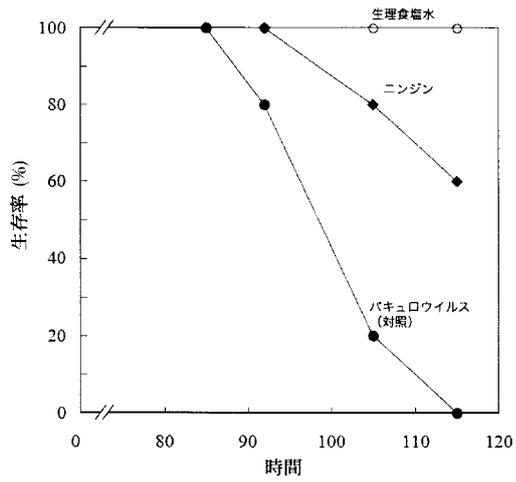
【図6】



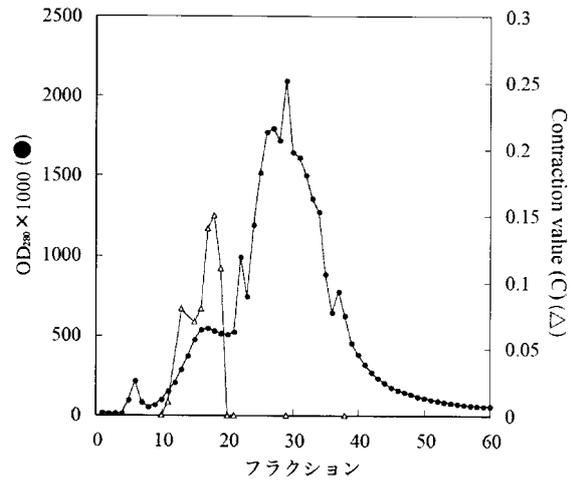
【図8】



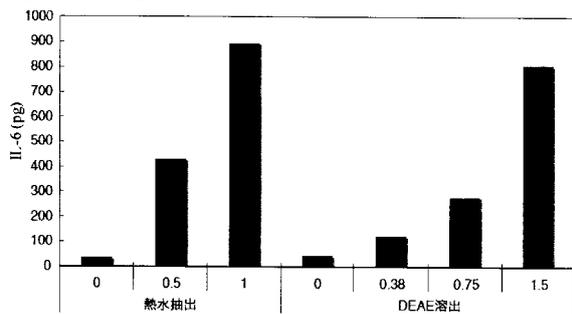
【図9】



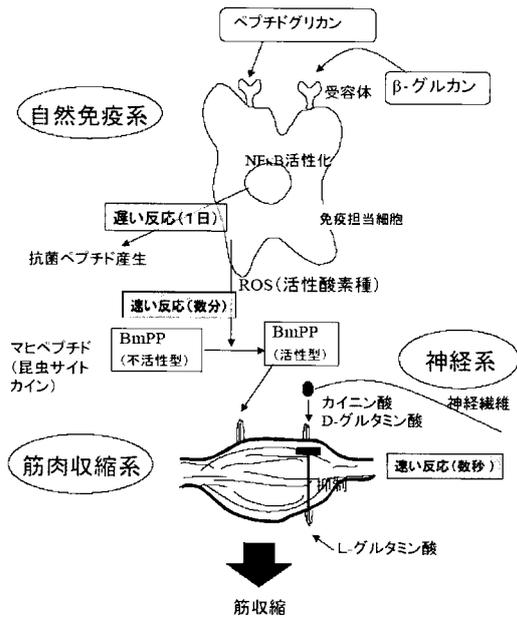
【図10】



【図11】



【図12】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 35/64	(2006.01)	A 6 1 K 35/78	C
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 K 35/64	
		A 6 1 P 37/02	

(72)発明者 浜本 洋  
 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

審査官 三木 隆

(56)参考文献 国際公開第2001/086287(WO, A1)  
 和合治久、後藤清、養魚への免疫賦活物質利用の可能性「混合飼料B」、養殖、1998, Vol.35,  
 No.1, Page.118-119  
 J Cancer Res Clin Oncol, 1992年, Vol.118, No.6, Page.447-452  
 J Biochem, 2005年, Vol.137, No.2, Page.199-203  
 J Neurochem, 2005年, Vol.95, No.4, Page.913-918  
 J Biol Chem, 2008.01.25, Vol.283, No.4, Page.2185-2191  
 Insect Biochem Mol Biol, 1999, Vol.29, No.12, Page.1075-1086  
 Eur J Pharmacol, 1990, Vol.185, No.2/3, Page.169-178  
 Arch Insect Biochem Physiol, 1996, Vol.33, No.2, Page.163-180

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 5 0  
 A 2 3 L 1 / 3 0  
 A 6 1 K 3 5 / 6 4  
 A 6 1 K 3 6 / 1 8  
 A 6 1 K 4 5 / 0 0  
 A 6 1 P 3 7 / 0 2  
 G 0 1 N 3 3 / 1 5  
 C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S ( S T N )  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )