

明 細 書

発明の名称：

血清レジスチン濃度低下のためのクロレラ細胞壁破砕物の使用

技術分野

[0001] 本発明は、血清レジスチン濃度を低下させるための血清レジスチン濃度低下剤及び血清レジスチン濃度低下用飲食組成物並びに血清レジスチン濃度を低下させる方法及び血清レジスチン濃度を低下させるための使用に関する。

背景技術

[0002] 糖代謝異常と血液中のレジスチン濃度は相関しており (Scand J ClinLab Invest. 2007;67(2):215-25. Associations of resistin with inflammation and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. Mojiminiyi OA, Abdella NA.、及び、Metabolism. 2007 May;56(5):693-8. Serum resistin level is associated with insulin sensitivity in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. Tokuyama Y, Osawa H, Ishizuka T, Onuma H, Matsui K, Egashira T, Makino H, Kanatsuka A.)、レジスチンは脂肪細胞に働いて脂肪細胞の炎症を誘導し、インスリン抵抗性を誘導するサイトカイン産生を増加させるものとされている (PLoS One. 2006 Dec 20;1:e31. Human resistin is a systemic immune-derived proinflammatory cytokine targeting both leukocytes and adipocytes. Nagaev I, Bokarewa M, Tarkowski A, Smith U.)。

[0003] そのため、安全で経口投与に適し、血液中のレジスチン濃度を有効に低下させることのできる血清レジスチン濃度低下剤及び血清レジスチン濃度低下用飲食組成物並びに血清レジスチン濃度を低下させる方法及び血清レジスチン濃度を低下させるための使用が要望されている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Scand J ClinLab Invest. 2007;67(2):215-25. Associations

of resistin with inflammation and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. Mojiminiyi OA, Abdella NA.

非特許文献2: Metabolism. 2007 May;56(5):693-8. Serum resistin level is associated with insulin sensitivity in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. Tokuyama Y, Osawa H, Ishizuka T, Onuma H, Matsui K, Egashira T, Makino H, Kanatsuka A.

非特許文献3: PLoS One. 2006 Dec 20;1:e31. Human resistin is a systemic immune-derived proinflammatory cytokine targeting both leukocytes and adipocytes. Nagaev I, Bokarewa M, Tarkowski A, Smith U.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0005] 本発明は、上記のような点に鑑み行われたものであって、その目的とするところは、長期に亘って安全且つ簡便に投与し得る血清レジスチン濃度低下剤及び血清レジスチン濃度低下用飲食組成物並びに長期に亘って安全且つ簡便に行い得る血清レジスチン濃度を低下させる方法及び血清レジスチン濃度を低下させるための使用を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0006] 上記目的を達成する本発明の血清レジスチン濃度低下剤は、クロレラの細胞壁破砕物を含有してなるものである。
- [0007] また本発明の血清レジスチン濃度低下用飲食組成物は、クロレラの細胞壁破砕物を含有してなるものである。
- [0008] また本発明の方法は、クロレラの細胞壁破砕物を適用することによる血清レジスチン濃度を低下させる方法である。
- [0009] また本発明の使用は、血清レジスチン濃度を低下させるためのクロレラの細胞壁破砕物の使用である。
- [0010] 本発明の血清レジスチン濃度低下剤又は血清レジスチン濃度低下用飲食組成物を適用することにより、或いは、本発明の血清レジスチン濃度を低下させる方法又はクロレラの細胞壁破砕物の使用により、血清レジスチン濃度を

効果的に低下させ得る。

- [0011] 本発明の血清レジスチン濃度低下剤はレジスチン遺伝子の発現を低下させるものとすることができる。
- [0012] また本発明の血清レジスチン濃度低下用飲食組成物は、レジスチン遺伝子の発現を低下させるものとすることができる。
- [0013] 本発明の血清レジスチン濃度を低下させる方法は、レジスチン遺伝子の発現を低下させるものとすることができる。
- [0014] また本発明のクロレラの細胞壁破砕物の使用は、レジスチン遺伝子の発現を低下させるためのものとすることができる。
- [0015] 上記本発明の血清レジスチン濃度低下剤は、CTBP1 遺伝子の発現を亢進させるものとすることができる。
- [0016] また上記本発明の血清レジスチン濃度低下用飲食組成物は、CTBP1 遺伝子の発現を亢進させるものとすることができる。
- [0017] 本発明の血清レジスチン濃度を低下させる方法は、CTBP1 遺伝子の発現を亢進させるものとすることができる。
- [0018] また本発明のクロレラの細胞壁破砕物の使用は、CTBP1 遺伝子の発現を亢進させるものとすることができる。
- [0019] CTBP1 遺伝子は、レジスチン遺伝子の発現を負に制御する。
- [0020] 上記本発明の血清レジスチン濃度低下剤は、CTBP2 遺伝子の発現を亢進させるものとすることができる。
- [0021] また上記本発明の血清レジスチン濃度低下用飲食組成物は、CTBP2 遺伝子の発現を亢進させるものとすることができる。
- [0022] 本発明の血清レジスチン濃度を低下させる方法は、CTBP2 遺伝子の発現を亢進させるものとすることができる。
- [0023] また本発明のクロレラの細胞壁破砕物の使用は、CTBP2 遺伝子の発現を亢進させるものとすることができる。
- [0024] CTBP2 遺伝子は、レジスチン遺伝子の発現を負に制御する。
- [0025] 上記本発明の血清レジスチン濃度低下剤は、RXR- α 1 β 遺伝子の

発現を亢進させるものとすることができる。

[0026] また上記本発明の血清レジスチン濃度低下用飲食組成物は、R X R - a l p h a 遺伝子の発現を亢進させるものとすることができる。

[0027] 本発明の血清レジスチン濃度を低下させる方法は、R X R - a l p h a 遺伝子の発現を亢進させるものとすることができる。

[0028] また本発明のクロレラの細胞壁破砕物の使用は、R X R - a l p h a 遺伝子の発現を亢進させるものとすることができる。

[0029] R X R - a l p h a 遺伝子は、レジスチン遺伝子の発現を負に制御する。

[0030] 本発明の血清レジスチン濃度低下剤におけるクロレラは、クロレラ・ピレノイドサであるものとすることができる。

[0031] また本発明の血清レジスチン濃度低下用飲食組成物におけるクロレラは、クロレラ・ピレノイドサであるものとすることができる。

[0032] 本発明の血清レジスチン濃度を低下させる方法におけるクロレラは、クロレラ・ピレノイドサであるものとすることができる。

[0033] また本発明のクロレラの細胞壁破砕物の使用におけるクロレラは、クロレラ・ピレノイドサであるものとすることができる。

[0034] 本発明の血清レジスチン濃度低下剤は、経口投与剤であるものとすることができる。

[0035] 本発明の血清レジスチン濃度を低下させる方法においては、クロレラの細胞壁破砕物を経口投与により適用するものとすることができる。

[0036] また本発明のクロレラの細胞壁破砕物の使用においては、クロレラの細胞壁破砕物を経口投与するものとすることができる。

[0037] なお、本発明における”血清レジスチン濃度低下剤”は、”血清レジスチン濃度低下用の物質”と言い換えることができる。

[0038] また、本発明の血清レジスチン濃度低下剤又は血清レジスチン濃度低下用飲食組成物を適用することによる血清レジスチン濃度を低下させる方法は、クロレラの細胞壁破砕物を適用することによる血清レジスチン濃度を低下させる方法と言い換えることができる。

発明の効果

[0039] 本発明の血清レジスチン濃度低下剤及び血清レジスチン濃度低下用飲食組成物は、長期に亘って安全且つ簡便に投与し得、血清レジスチン濃度を効果的に低下させ得る。本発明の血清レジスチン濃度を低下させる方法及び血清レジスチン濃度を低下させるための使用は、長期に亘って安全且つ簡便に行い得、血清レジスチン濃度を効果的に低下させ得る。

図面の簡単な説明

[0040] [図1]血清レジスチン濃度についての試験期間前（0 w）及び試験期間経過後（12 w）の測定結果である。

[図2]レジスチンmRNAに対する2つのプローブA_33_P3350863及びA_23_P119222についての試験期間前（0 w）及び試験期間経過後（12 w）の測定結果である。

[図3]レジスチン遺伝子の発現を負に制御する遺伝子であるCTBP1遺伝子、CTBP2遺伝子及びRXR- α 遺伝子の発現についての試験期間前（0 w）及び試験期間経過後（12 w）の測定結果である。

発明を実施するための形態

[0041] 本発明におけるクロレラとは、クロレラ属(*Chlorella*) に属する単細胞緑藻類であって、例えば、*Chlorella pyrenoidosa*、*Chlorella ellipsoidea*、*Chlorella vulgaris*、*Chlorella regularis* 等を挙げることができる。本発明に最も適しているのは、クロレラ・ピレノイドサ (*Chlorella pyrenoidosa*) である。

[0042] 本発明の血清レジスチン濃度低下剤及び血清レジスチン濃度低下用飲食組成物並びに血清レジスチン濃度を低下させる方法及び血清レジスチン濃度を低下させるための使用におけるクロレラの細胞壁破碎物は、例えば次のようにして得ることができる。すなわち、先ずクロレラ濃度10乃至25重量%のクロレラ粉体・水懸濁液を10℃以下に調整する。次にこの懸濁液を、下記のような連続湿式微粉碎機に送入し、破碎直後のスラリーが40℃以下になるよう微粉碎する。次いで、このようにして得られたクロレラスラリーを

、直ちに10℃以下に冷却することにより、細胞壁が破砕されたクロレラを、品質劣化を生じさせることなく得ることができる。

[0043] 上記連続湿式微粉碎機は、冷却外套を持つ密閉シリンダー中に多数の直径0.5乃至1.5mmのガラスビーズが封入されたものである。そのガラスビーズ容量は密閉シリンダー容量の80乃至85%であり、ガラスビーズを流入液体と混和・回転することにより、流入液体中の物質を摩砕するものである。

[0044] このようにして細胞壁が破砕されたクロレラは、そのまま用いることもできるが、例えば、真空乾燥後粉碎を行う等の適宜の処理を施した後に使用してもよい。

[0045] 本発明の血清レジスチン濃度低下剤及び血清レジスチン濃度低下用飲食組成物並びに血清レジスチン濃度を低下させる方法及び血清レジスチン濃度を低下させるための使用におけるクロレラの細胞壁破砕物は、経口投与に適する。成人に対するクロレラ・ピレノイドサの細胞壁破砕物（又はその他のクロレラの細胞壁破砕物）の投与量は、1日当たり1乃至35g程度が適当である。但し、クロレラ・ピレノイドサ等のクロレラの細胞壁破砕物は人体に対する毒性を有しないため、これに限定されるものではない。

[0046] 本発明の血清レジスチン濃度低下剤並びに血清レジスチン濃度を低下させる方法及び血清レジスチン濃度を低下させるための使用における経口投与の形態に特に限定はないが、例えば、粉末、錠剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤とすることができる。

[0047] また種々の形態を形成する上で、各種賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、コーティング剤、着色剤、矯味剤、矯臭剤、可塑剤等を適宜用いることができる。

[0048] 賦形剤の例としては、糖類（乳糖，白糖，ブドウ糖，マンニトール），デンプン（バレイショ，コムギ，トウモロコシ），無機物（炭酸カルシウム，硫酸カルシウム，炭酸水素ナトリウム，塩化ナトリウム），結晶セルロース，植物末（カンゾウ末，ゲンチアナ末）等を挙げることができる。

- [0049] 結合剤の例としては、デンプンのり液、アラビアゴム、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、メチ／レセルローズ（MC）、エチルセルローズ（EC）、ポリビニルピロリドン（PVP）、ポリビニルアルコール（PVA）、ヒドロキシプロピルセルローズ（HPC）、カルボキシメチルセルローズ（CMC）等を挙げることができる。
- [0050] 崩壊剤の例としては、デンプン、寒天、ゼラチン末、結晶セルローズ、CMC・Na、CMC・Ca、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、アルギン酸ナトリウム等を挙げることができる。
- [0051] 滑沢剤の例としては、ステアリン酸マグネシウム、タルク、水素添加植物油、マクロゴール、シリコン油等を挙げることができる。
- [0052] コーティング剤の例としては、糖衣（白糖、HPC、セラック）、膠衣（ゼラチン、グリセリン、ソルビトール）、フィルムコーティング〔ヒドロキシプロピルメチルセルローズ（HPMC）、EC、HPC、PVP〕、腸溶性コーティング〔ヒドロキシプロピルメチルセルローズフタレート（HPMC F）、セルローズアセテートフタレート（CAP）〕等を挙げることができる。
- [0053] 着色剤の例としては、水溶性食用色素、レーキ色素）等を挙げることができる。矯味剤の例としては、乳糖、白糖、ブドウ糖、マンニトール）等を挙げることができる。矯臭剤の例としては、芳香性精油類）、光線遮断剤（酸化チタン）等を挙げることができる。可塑剤の例としては、フタル酸エステル類、植物油、ポリエチレングリコール）等を挙げることができる。
- [0054] 本発明の血清レジスチン濃度低下用飲食組成物は、例えば栄養食品、栄養補助食品又は飲料用液体等を構成する飲食組成物中にクロレラの細胞壁破砕物を含有した形態とすることができ、本発明の効果を損なわない各種成分を含むものとすることができる。
- [0055] このような血清レジスチン濃度低下剤及び血清レジスチン濃度低下用飲食組成物は、長期に亘って安全且つ簡便に投与し得、血清レジスチン濃度を効果的に低下させ得る。また、このような血清レジスチン濃度を低下させる方

法及び血清レジスチン濃度を低下させるための使用は、長期に亘って安全且つ簡便に行い得、血清レジスチン濃度を効果的に低下させ得る。

実施例

[0056] クロレラ細胞壁破砕物の経口投与が、血清レジスチン濃度、レジスチン遺伝子の発現、及び、レジスチン遺伝子の発現を負に制御する遺伝子の発現に与える効果についての試験を行った。

[0057] 1. 被験物質の製造

[0058] 被験物質である細胞壁を破砕したクロレラ・ピレノイドサ (*Chlorella pyrenoidosa*) の乾燥粉末（以下、単に「クロレラ」とも言う。）を、次のように製造した。

[0059] 冷却外套を持つ密閉シリンダー中にその密閉シリンダー容量の80乃至85%の容量の多数の直径0.5乃至1.5mmのガラスビーズが封入されており、そのガラスビーズを流入液体と混和・回転することにより流入液体中の物質を摩砕する連続湿式微粉碎機（商品名：ダイノミル〔KD型〕 WAB, Inc.製）に、10℃以下に調整されたクロレラ・ピレノイドサ濃度10乃至25重量%のクロレラ・ピレノイドサ粉体・水懸濁液を送入して、破砕直後のスラリーが40℃以下になるよう微粉碎し、次いで、このようにして得られたクロレラ・ピレノイドサスラリーを、直ちに10℃以下に冷却し、真空乾燥後、粉碎することにより、被験物質である細胞壁破砕クロレラ・ピレノイドサ乾燥粉末（株式会社サン・クロレラ製の細胞壁破砕クロレラ粉末）が得られた。

[0060] 2. 試験方法

[0061] 被験者28名（HbA1cが5.3%以上、6.1%未満の42乃至49歳の男性）に対し、12週間（試験期間）にわたり、被験物質を毎朝食前及び毎夕食前にそれぞれ3.83g（1日当たり7.66g）経口投与した。

[0062] 試験期間初日の被験物質経口投与前（0w）と、試験期間経過翌日の朝食前（12w）に、それぞれ末梢血の採血を行い、血清レジスチン濃度、レジスチン遺伝子の発現、及び、レジスチン遺伝子の発現を負に制御する遺伝子

の発現に関する測定に供する検体とした。なお、試験期間初日の前日 21 時以降、初日の採血までは、水以外の摂取を禁止した。

[0063] 3. 測定方法

(1) レジスチン濃度

[0064] 検体についてヒトレジスチンELISAキット（商品名：Human Resistin ELISA BioVendor Laboratorni medicina a.s.社製）を用いてELISAによるレジスチンの検出を行い、マイクロプレートリーダーを使って主波長450nm、副波長630nmで各ウェルの吸光値を測定することによりレジスチン濃度を測定した。

(2) 遺伝子発現

[0065] 検体を収容したRNA単離用真空採血管（商品名：PAXgene Blood RNA Tube BD社製）から、RNA抽出キット（商品名：PAXgene Blood miRNA Kit QIAGEN社製）を用いてtotal RNAの抽出を行なった。

[0066] 抽出したtotal RNAについて、分光光度計（商品名：NanoDrop 1000 Thermo Scientific社製）により収量を測定し、分析機（商品名：Agilent 2100 Bioanalyzer Agilent Technologies社製）により分解度を測定した。

[0067] マイクロアレイ解析は、遺伝子発現マイクロアレイ（商品名：SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray Agilent Technologies社製）を用いて行った。標識cRNAの作成は、total RNA 100ngから、遺伝子発現マイクロアレイラベル化キット（商品名：Low Input Quick Amp Labeling Kit Agilent Technologies社製）を用いてその標準プロトコルに従って行なった。標識方法は1色法とし、Cyanine 3を用いた。

[0068] マイクロアレイのスキャンは、マイクロアレイスキャナ（商品名：G2505C DNA microarray scanner Agilent Technologies社製）により行い、数値化は、マイクロアレイ画像数値化ソフト（商品名：Feature Extraction Software ver.10.7.3.1 Agilent Technologies社製）を用いて行なった。

[0069] 4. 結果

[0070] 試験期間前（0w）と、試験期間経過後（12w）のそれぞれにおける血清レジスチン濃度、レジスチン遺伝子の発現、及び、レジスチン遺伝子の発

現を負に制御する遺伝子の発現に関する測定結果は次の通りであった。

(1) 血清レジスチン濃度

[0071] 血清レジスチン濃度についての試験期間前（0 w）及び試験期間経過後（12 w）の測定結果は図1に記載の通りであり、被験物質の経口投与による血清レジスチン濃度の有意な低下が認められた。血清レジスチン濃度の被験者の平均値は、試験期間前（0 w）において5.47 ng/mL、試験期間経過後（12 w）において5.02 ng/mLであった。

(2) レジスチン遺伝子の発現

[0072] レジスチンmRNAに対する2つのプローブA_33_P3350863及びA_23_P119222の試験期間前（0 w）及び試験期間経過後（12 w）の測定結果は図2に記載の通りであり、被験物質の経口投与によるレジスチン遺伝子の発現の有意な抑制が認められた。

(3) レジスチン遺伝子の発現を負に制御する遺伝子の発現

[0073] レジスチン遺伝子の発現を負に制御する遺伝子であるCTBP1遺伝子、CTBP2遺伝子及びRXR- α 遺伝子の発現についての試験期間前（0 w）及び試験期間経過後（12 w）の測定結果は図3に記載の通りであり、被験物質の経口投与によるレジスチン遺伝子の発現を負に制御する前記各遺伝子の発現の有意な亢進が認められた。

請求の範囲

- [請求項1] クロレラの細胞壁破砕物を含有してなる血清レジスチン濃度低下剤。
- [請求項2] レジスチン遺伝子の発現を低下させるものである請求項1記載の血清レジスチン濃度低下剤。
- [請求項3] C T B P 1 遺伝子の発現を亢進させるものである請求項1又は2記載の血清レジスチン濃度低下剤。
- [請求項4] C T B P 2 遺伝子の発現を亢進させるものである請求項1又は2記載の血清レジスチン濃度低下剤。
- [請求項5] R X R - a l p h a 遺伝子の発現を亢進させるものである請求項1又は2記載の血清レジスチン濃度低下剤。
- [請求項6] 上記クロレラがクロレラ・ピレノイドサである請求項1乃至5の何れか1項に記載の血清レジスチン濃度低下剤。
- [請求項7] 経口投与剤である請求項1乃至6の何れか1項に記載の血清レジスチン濃度低下剤。
- [請求項8] クロレラの細胞壁破砕物を含有してなる血清レジスチン濃度低下用飲食組成物。
- [請求項9] レジスチン遺伝子の発現を低下させるものである請求項8記載の血清レジスチン濃度低下用飲食組成物。
- [請求項10] C T B P 1 遺伝子の発現を亢進させるものである請求項8又は9記載の血清レジスチン濃度低下用飲食組成物。
- [請求項11] C T B P 2 遺伝子の発現を亢進させるものである請求項8又は9記載の血清レジスチン濃度低下用飲食組成物。
- [請求項12] R X R - a l p h a 遺伝子の発現を亢進させるものである請求項8又は9記載の血清レジスチン濃度低下用飲食組成物。
- [請求項13] 上記クロレラがクロレラ・ピレノイドサである請求項8乃至12の何れか1項に記載の血清レジスチン濃度低下用飲食組成物。
- [請求項14] クロレラの細胞壁破砕物を適用することによる血清レジスチン濃度

を低下させる方法。

- [請求項15] レジスチン遺伝子の発現を低下させるものである請求項14記載の方法。
- [請求項16] C T B P 1 遺伝子の発現を亢進させるものである請求項14又は15記載の方法。
- [請求項17] C T B P 2 遺伝子の発現を亢進させるものである請求項14又は15記載の方法。
- [請求項18] R X R - a l p h a 遺伝子の発現を亢進させるものである請求項14又は15記載の方法。
- [請求項19] 上記クロレラがクロレラ・ピレノイドサである請求項14乃至18の何れか1項に記載の方法。
- [請求項20] クロレラの細胞壁破砕物を経口投与により適用するものである請求項14乃至20の何れか1項に記載の方法。
- [請求項21] 血清レジスチン濃度を低下させるためのクロレラの細胞壁破砕物の使用。
- [請求項22] レジスチン遺伝子の発現を低下させるものである請求項21記載の使用。
- [請求項23] C T B P 1 遺伝子の発現を亢進させるものである請求項21又は22記載の使用。
- [請求項24] C T B P 2 遺伝子の発現を亢進させるものである請求項21又は22記載の使用。
- [請求項25] R X R - a l p h a 遺伝子の発現を亢進させるものである請求項21又は22記載の使用。
- [請求項26] 上記クロレラがクロレラ・ピレノイドサである請求項21乃至25の何れか1項に記載の使用。
- [請求項27] クロレラの細胞壁破砕物を経口投与するものである請求項21乃至26の何れか1項に記載の使用。