

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/004916

発行日 平成24年1月5日 (2012.1.5)

(43) 国際公開日 平成22年1月14日 (2010.1.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A61K 31/7004 (2006.01)	A61K 31/7004	4B018
A61P 3/10 (2006.01)	A61P 3/10	4C057
A61K 31/715 (2006.01)	A61K 31/715	4C086
A23L 1/30 (2006.01)	A23L 1/30 Z	4C090
C07H 3/02 (2006.01)	C07H 3/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 40 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2010-519750 (P2010-519750)	(71) 出願人 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
(21) 国際出願番号 PCT/JP2009/061978	
(22) 国際出願日 平成21年6月30日 (2009.6.30)	
(31) 優先権主張番号 特願2008-178450 (P2008-178450)	(71) 出願人 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
(32) 優先日 平成20年7月8日 (2008.7.8)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100125748 弁理士 高橋 徳明
	(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
	(72) 発明者 松本 靖彦 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

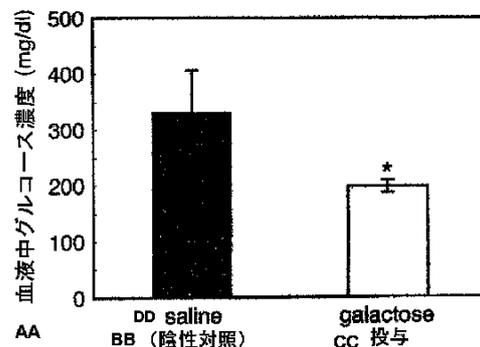
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血糖低下剤及びそれを添加してなる糖尿病の予防又は症状改善のための飲食品

(57) 【要約】

従来の2型糖尿病治療薬の有している副作用が少ない血糖低下剤であって、長期の服用や予防的な使用にも問題がほとんどなく、また飲食品中に添加して使用することにも適した血糖低下剤を提供することを課題にし、ガラクトース、ガラクトース誘導体又は単離されたガラクトースホモポリマーを有効成分として含有することを特徴とする血糖低下剤；その血糖低下剤を添加した糖尿病の予防又は症状改善のための飲食品；ガラクトース、ガラクトース誘導体又は単離されたガラクトースホモポリマーが血糖低下の有効成分として添加されてなることを特徴とする飲食品；により上記課題を解決した。

[図17]



AA BLOOD GLUCOSE LEVEL (mg/dl)
BB (NEGATIVE CONTROL)
CC ADMINISTRATION

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ガラクトース又はガラクトース誘導体を有効成分として含有することを特徴とする血糖低下剤。

【請求項 2】

単離されたガラクトースホモポリマーを有効成分として含有することを特徴とする血糖低下剤。

【請求項 3】

請求項 1 又は請求項 2 に記載の血糖低下剤を添加してなることを特徴とする糖尿病の予防又は症状改善のための飲食品。

【請求項 4】

ガラクトース又はガラクトース誘導体が血糖低下の有効成分として添加されてなることを特徴とする飲食品。

【請求項 5】

単離されたガラクトースホモポリマーが血糖低下の有効成分として添加されてなることを特徴とする飲食品。

【請求項 6】

ガラクトース又はガラクトース誘導体を有効成分とする薬剤を投与することを特徴とする糖尿病の治療方法。

【請求項 7】

単離されたガラクトースホモポリマーを有効成分とする薬剤を投与することを特徴とする糖尿病の治療方法。

【請求項 8】

上記ガラクトース又はガラクトース誘導体が、少なくとも以下の工程 (a) ないし (d) を含む工程によって決定されたものである請求項 1 に記載の血糖低下剤。

(a) 無脊椎動物に糖 (A) を摂取させることによって、該無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖 (B) の濃度を上昇させる工程

(b) 上記工程 (a) で得られた、脂肪体中又は血液中の糖 (B) の濃度が上昇した無脊椎動物に、被検物質を投与する工程

(c) 上記被検物質が投与された無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖 (B) の濃度を測定する工程

(d) 上記被検物質の中から、該無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖 (B) の濃度を低下させる物質を選択する工程

【請求項 9】

上記ガラクトース又はガラクトース誘導体が、少なくとも以下の工程 (a) ないし (d) を含む工程によって決定されたものである請求項 4 に記載の飲食品。

(a) 無脊椎動物に糖 (A) を摂取させることによって、該無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖 (B) の濃度を上昇させる工程

(b) 上記工程 (a) で得られた、脂肪体中又は血液中の糖 (B) の濃度が上昇した無脊椎動物に、被検物質を投与する工程

(c) 上記被検物質が投与された無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖 (B) の濃度を測定する工程

(d) 上記被検物質の中から、該無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖 (B) の濃度を低下させる物質を選択する工程

【請求項 10】

上記ガラクトース又はガラクトース誘導体が、少なくとも以下の工程 (a) ないし (d) を含む工程によって決定されたものである請求項 6 に記載の糖尿病の治療方法。

(a) 無脊椎動物に糖 (A) を摂取させることによって、該無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖 (B) の濃度を上昇させる工程

(b) 上記工程 (a) で得られた、脂肪体中又は血液中の糖 (B) の濃度が上昇した無脊

10

20

30

40

50

椎動物に、被検物質を投与する工程

(c) 上記被検物質が投与された無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖(B)の濃度を測定する工程

(d) 上記被検物質の中から、該無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖(B)の濃度を低下させる物質を選択する工程

【請求項11】

少なくとも以下の工程(a)ないし(d)を含み、被検物質がガラクトース誘導体であることを特徴とする糖尿病の治療薬のスクリーニング方法。

(a) 無脊椎動物に糖(A)を摂取させることによって、該無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖(B)の濃度を上昇させる工程

(b) 上記工程(a)で得られた、脂肪体中又は血液中の糖(B)の濃度が上昇した無脊椎動物に、被検物質を投与する工程

(c) 上記被検物質が投与された無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖(B)の濃度を測定する工程

(d) 上記被検物質の中から、該無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖(B)の濃度を低下させる物質を選択する工程

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は血糖低下剤とそれを添加した糖尿病の予防又は症状改善のための飲食品に関する。また、糖尿病の治療方法及び糖尿病の治療薬のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ジオウは古くからその増血作用により滋養強壯で知られる重要な漢方薬であり、他の漢方薬と組み合わせることで血行不良によるしびれ、皮膚の乾燥やかゆみ、前立腺肥大等の薬として幅広く用いられている。また血糖低下効果も有することが知られており、糖尿病治療剤の構成成分としても検討されている(例えば、特許文献1)。また、ジオウの熱水抽出液のエタノール沈殿画分に血糖低下効果があることが報告されている(非特許文献1)。しかしながら現在に至るまでジオウの示す血糖低下効果の主体は明らかとなっておらず、その適切な使い方は確立されていない。

【0003】

糖尿病は慢性の高血糖状態の持続及び耐糖能の異常を示す疾患である。糖尿病は初期段階では自覚症状がほとんどなく、重篤な合併症である様々な臓器障害(腎症、末梢神経障害、網膜症等)に至ってしまうため、大幅な生活の質の低下をもたらす、治療にも多くの社会資源を必要とする等、多くの問題を発生させる疾患である。そして世界的にもその有病者が急激に増加していることから、国連でその撲滅が決議されるほどの大きな社会的問題となっている。

【0004】

糖尿病は、大きく1型と2型に分けられるが、社会的に問題視されているのは2型である。2型糖尿病は、遺伝的な背景による場合と肥満による場合がその原因の大半を占めており、インスリン分泌量の低下やインスリンに対する感受性の低下(インスリン抵抗性)を基礎とする疾患で、日本では糖尿病患者の95%がこの2型とされている。2型糖尿病は生活習慣病の側面も強く、近年の肥満化高齢化に伴って更に増加傾向にある。

【0005】

2型糖尿病の治療としては一般に食事療法と運動療法が行われるが、良好な血糖コントロールが達成できない場合は、経口血糖低下薬の服用やインスリン注射が行われる。経口血糖低下薬は、その作用機序により、インスリン分泌促進薬、インスリン抵抗性改善薬、
- グルコシダーゼ阻害薬等がある。

【0006】

しかし、これらは何れも過度の投与や長期の使用により、肥満やインスリン抵抗性の増

10

20

30

40

50

悪、重篤な低血糖症等の血糖値コントロールの不全等をもたらすことがあるとされている。そのため、新たな治療薬・予防薬、機能性食品等が強く求められ、その開発が進められている。それらの中には糖を構成単位に含んでいるものもあり、例えば、特許文献2にはグアガム等のガラクトマンナン分解物や、難消化性デキストリン等の食物繊維、及びポリフェノールを含有する糖尿病予防又は治療用組成物が示されており、特許文献3には、ヘパリンやヘパラン硫酸を有効成分とする血糖低下剤が開示されている。

【0007】

しかしながら、これら治療薬・予防薬、機能性食品等は、十分にその効果が確認されおらず、更に良好な血糖コントロールが達成できるものの開発が望まれていた。

【0008】

一方、本発明者は、哺乳類に代替し得る実験動物として、カイコに着目し、これまでヒト等に感染する菌やウイルスに対する治療薬開発のための評価系に用いることができることを報告した(特許文献4、特許文献5)。この評価系は、初めて無脊椎動物を用いたものであり、従来の実験動物に比してコストや倫理面での問題が少なく、また精度管理用の動物も置くことができるため、これまで実験動物を用いた検討に載せられることのなかった対象物を含め、より広範な対象物を評価でき、また正確な評価ができる等多くの利点を持つ方法である。

【0009】

そして更に、本発明者は、カイコを用いた上記評価系が、哺乳類の2型糖尿病治療薬の評価系として用いることができることを新たに見出して既に出願した。しかしながら、その評価系を用いて、良好な血糖コントロールができる新規の2型糖尿病治療薬・予防薬、機能性食品等は、具体的にはまだ見出せていなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特開平08-198768号公報

【特許文献2】特開2006-052191号公報

【特許文献3】特開2004-168771号公報

【特許文献4】特開2007-327964号公報

【特許文献5】W02005/116269号公報

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】J.Pharm.Soc.Jpn., T.Kihoet al., 112(6), 393-400 (1992)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は、上記背景技術に鑑みてなされたものであり、その課題は、従来2型糖尿病治療薬の有する重篤な低血糖症をもたらす等の副作用が少なく、長期の服用や予防的な使用にも問題がほとんどなく、また飲食品中に添加して使用することにも適した血糖低下剤を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者は、前記の課題を解決すべく、古くから滋養強壮効果、血糖低下効果、安全性等に定評のあるジオウについて、カイコガの幼虫(以下、「カイコ」と記す)による2型糖尿病治療薬の評価系を用いて鋭意検討を重ねた結果、ジオウの熱水抽出画分が高血糖カイコの血糖値を低下させることを確認した。

【0014】

また、この熱水抽出画分を単糖類にまで加水分解したところ、そこに含まれる主な構成糖がガラクトースであることを見出した。そして、高血糖カイコの血糖値を低下させる「ジオウの熱水抽出画分」中の成分がガラクトースホモポリマーであることを確認し、単離

10

20

30

40

50

されたガラクトースホモポリマーが血糖値を低下させることを見出して本発明に至った。

【0015】

そして、更に驚くべきことに、ジオウ自体には含まれていない、単糖類であるガラクトースが、高血糖カイコ及び高血糖マウスの血糖値を低下させることを見出して本発明に至った。

【0016】

すなわち、本発明は、ガラクトース又はガラクトース誘導体を有効成分として含有することを特徴とする血糖低下剤を提供するものである。

【0017】

また、本発明は、単離されたガラクトースホモポリマーを有効成分として含有することを特徴とする血糖低下剤を提供するものである。

【0018】

また、本発明は、上記の血糖低下剤を添加してなることを特徴とする糖尿病の予防又は症状改善のための飲食品を提供するものであり、また、ガラクトース又はガラクトース誘導体が血糖低下の有効成分として添加されてなることを特徴とする飲食品を提供するものである。また、単離されたガラクトースホモポリマーが血糖低下の有効成分として添加されてなることを特徴とする飲食品を提供するものである。

【0019】

また、本発明は、ガラクトース又はガラクトース誘導体を有効成分とする薬剤を投与することを特徴とする糖尿病の治療方法を提供するものであり、また、単離されたガラクトースホモポリマーを有効成分とする薬剤を投与することを特徴とする糖尿病の治療方法を提供するものである。

【0020】

また、本発明は、少なくとも以下の工程(a)ないし(d)を含み、被検物質がガラクトース誘導体であることを特徴とする糖尿病の治療薬のスクリーニング方法を提供するものである。

(a) 無脊椎動物に糖(A)を摂取させることによって、該無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖(B)の濃度を上昇させる工程

(b) 上記工程(a)で得られた、脂肪体中又は血液中の糖(B)の濃度が上昇した無脊椎動物に、被検物質を投与する工程

(c) 上記被検物質が投与された無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖(B)の濃度を測定する工程

(d) 上記被検物質の中から、該無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖(B)の濃度を低下させる物質を選択する工程

【発明の効果】

【0021】

本発明は、上記問題点と課題を解決できたものであり、本発明の血糖低下剤は、高血糖状態の動物の血糖値を低下させる効果を有し、糖尿病による高血糖状態を極めて顕著に改善する効果を有する。すなわち、本発明の血糖低下剤は、特に、2型糖尿病治療薬・予防薬、機能性食品用途に極めて効果的である。

【0022】

また、本発明の血糖低下剤の必須有効成分であるガラクトース又はガラクトース誘導体は、生命活動の必須成分として用いられている非常に安全な物質であるため、本発明の血糖低下剤も極めて安全で副作用もないものである。また、単離されたガラクトースホモポリマーも加水分解されてガラクトースになるので、ガラクトース同様安全である。また、各種の剤形にすることも容易であり、甘味料として用いることも可能な程に飲食品に添加することも容易なので、安全な血糖低下剤や機能性食品として、極めて効果的に糖尿病の予防や症状の改善を図ることができる。

【図面の簡単な説明】

【0023】

10

20

30

40

50

【図 1】5 齢 1 日目のカイコに 15% (w/w) グルコースを含む餌を 1 日間及び 3 日間与えたカイコにおける、血糖値又は糖濃度を表すグラフである (評価実験例 1)。(A) : 血液 (hemolymph) 中の血糖値 (B) : 脂肪体中の糖濃度

【図 2】グルコース 33% (w/w) を含む餌を摂取させたときの血糖値の経時的推移 (time course) を表すグラフである (評価実験例 2)。上から、「33% (w/w) グルコース添加飼料給餌群」、「通常飼料給餌群」、「絶食群」である。

【図 3】餌に含有されるグルコース量を変化させたときの、給餌開始後 60 分後の血糖値を示すグラフである (評価実験例 3)。

【図 4】インスリンによる高血糖状態のカイコの血糖値の低下作用を示すグラフである (評価実験例 4)。左から、「通常飼料給餌群に生理食塩水を投与」、「16% (w/w) グルコース添加飼料を与え 60 分後に生理食塩水を投与」、「16% (w/w) グルコース添加飼料を与え 60 分後にインスリンを投与」である。

【図 5】メトホルミンによる高血糖状態のカイコの血糖値の低下作用を示すグラフである (評価実験例 5)。左から、「通常飼料給餌群に生理食塩水を投与」、「16% (w/w) グルコース添加飼料を与え 60 分後に生理食塩水を投与」、「16% (w/w) グルコース添加飼料を与え 60 分後にメトホルミンを投与」である。

【図 6】インスリンのカイコの血糖値低下作用における ED50 値の算出に用いたグラフである (評価実験例 6)。

【図 7】グルコース 15% (w/w) を含む餌を摂取させたときの血糖値及び血液中のグルコース濃度の経時的推移を表すグラフである (評価実験例 7)。(a) : 血糖値 (b) : 血液中のグルコース濃度

【図 8】カイコにグルコース 12% (w/w) を含む餌を摂取させた後、絶食させたときのカイコの血糖値の経時的推移を表すグラフである (評価実験例 7)。

【図 9】餌に含有されるグルコース量を変化させたときの、給餌開始後 180 分後の血糖値を示すグラフである (評価実験例 3)。

【図 10】カイコに、通常飼料又は 5%、10%、15%、30% (w/w) グルコース添加飼料をそれぞれ与え又は何も与えずに飼育後のカイコの体長、体重、血糖値を表すものである (評価実験例 8)。(a) : カイコの状態を示す写真 (b) : 体重 (c) : 体長 (d) : 血糖値

【図 11】(a) カイコに、グルコース添加飼料及び「生理食塩水」又は「組み換え型ヒトインスリン」を投与後の血糖値の経時的推移を表すグラフである (評価実験例 9)。(b) カイコに、グルコース添加飼料を与えた後に各量の組み換え型ヒトインスリンを投与したときの血糖値を表すグラフである (評価実験例 9)。(c) 抗 Akt 抗体及び抗リン酸化 Akt 抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果を示すものである。(d) カイコから抽出した脂肪体のリン酸化 Akt の量を表すグラフである (評価実験例 9)。(e) カイコから抽出した脂肪体の糖取り込み量を表すグラフである (評価実験例 9)。

【図 12】AICAR 投与によるカイコの血糖値及び AMPK 活性の変化を示すグラフである (評価実験例 10)。(a) : 血糖値 (b) : AMPK 活性

【図 13】組み換え型ヒトインスリン注射によるカイコの体重及び体長の変化を表すものである (評価実験例 11)。(a) : 評価実験例概要 (b) : カイコの状態を示す写真 (c) : 体重 (d) : 体長

【図 14】ジオウ熱水抽出物のエタノール沈殿画分を構成する糖の分析結果を示す図で、TLC 上の移動度を D-ガラクトース等の標準糖と比較した結果を示す図である (実施例 1)。

【図 15】高血糖カイコモデルにジオウ熱水抽出物のエタノール沈殿画分を投与したときのカイコ体液中血糖値低下の効果を表す図である (実施例 2)。

【図 16】高血糖カイコモデルに D-ガラクトースを投与したときのカイコ体液中グルコース濃度低下の効果を表す図である (実施例 2)。

【図 17】高血糖マウスモデルに D-ガラクトースを投与したときのマウス血液中グルコ

10

20

30

40

50

ース濃度低下の効果を示す図である（実施例 3）。

【図 18】ジオウからジオウ熱水抽出物のエタノール沈殿画分を得る方法を示した図である（実施例 1）。

【発明を実施するための形態】

【0024】

以下、本発明について説明するが、本発明は以下の実施の形態に限定されるものではなく、任意に変形して実施することができる。

【0025】

〔ガラクトース又はガラクトース誘導体〕

本発明における「ガラクトース又はガラクトース誘導体」とは、D-ガラクトース及びその誘導体のことをいう。また、 α 型と β 型を含む。すなわち、D-ガラクトースの場合、 $[\alpha]_D^{20} = +144^\circ$ の α 型、 $[\beta]_D^{20} = +52^\circ$ の β 型を含む。本発明における「ガラクトース又はガラクトース誘導体」は単糖類であり、本発明における「ガラクトース誘導体」には、ガラクトースを構成成分とする2糖類、3糖類等の多糖類は含まれない。

10

【0026】

ガラクトース誘導体としては、例えば、ガラクトースの環に置換基が結合したのもも挙げられる。置換基としては、メチル基、エチル基、プロピル基等のアルキル基；フェニル基等のアリール基；ベンジル基等のアリールアルキル基；アセチル基（エタノイル基）等のアルカノイル基等が挙げられる。本発明における「ガラクトース又はガラクトース誘導体」（以下、「ガラクトース（誘導体）」と略記する場合がある）は、ピラノース型もフラノース型も含まれる。

20

【0027】

また、ガラクトース誘導体は、ガラクトースと同様の代謝経路で利用されるものであれば、ガラクトースと同様の血糖低下効果があるものと考えられる。そのようなものとしては、例えば、ガラクトースの抱水体、アルデヒド体、O-メチル化体、O-硫酸化体、それらの薬理的に許容し得る塩、ガラクトースの代謝中間体であるUDP（ウリジン二リン酸）ガラクトース等が挙げられる。つまり、本発明の根幹の1つは、従来それ単独で血糖低下効果のあることが予測できなかったガラクトースという単糖に血糖低下効果があることを見出したことでもあるので、ガラクトースと同様の代謝経路で利用される単糖のガラクトース誘導体であれば本発明の範囲内のものである。

30

【0028】

ガラクトースが血糖低下作用を示すのは、ガラクトースが未同定の細胞に作用するからである。その細胞が何らかのメカニズムにより、血糖値を下げる作用をもたらしていると考えられる。ガラクトースのような生体物質が細胞に作用する場合には、細胞表面上の受容体（receptor）タンパク質と結合し、そのシグナルが細胞内に伝達される、ということが現代生物学における一般的理解である。従って、ガラクトースが作用する受容体に親和性のある物質であれば、ガラクトースでなくとも、ガラクトースと同様に血糖低下作用を示すものが存在すると考えられる。ガラクトースの誘導体の中にはそのような受容体への親和性を有するものがあるはずである。従って、かかるガラクトース誘導体も本発明の範囲である。そのようなガラクトース誘導体で、ガラクトースよりも有利な（例えば血液中での安定性がよい）物質があれば、血糖低下剤としては、ガラクトースよりも優れていると言える。すなわち、ガラクトースと同じ性能を有する、ガラクトースと同等、又はより利便性のあるガラクトース誘導体が存在し得ることは、論理的に自明である。

40

【0029】

ガラクトースは、天然には、主にD-グルコースと結合して2糖類である乳糖の構成糖として、 β -D-ガラクトースとして存在する。また、寒天を形成しているアガロースは、1-3結合 β -D-ガラクトースと1-4結合 α -D-グルコース、6-アンヒドロ α -D-グルコースとが交互に直鎖状に並んだ多糖類である。このようにガラクトースを構成成分とする多糖類は天然には極めて多く存在するが、単糖であるガラクトースは、天然には極めて稀

50

にしか存在しておらず、従って通常の飲食品中には存在していない。

【 0 0 3 0 】

ガラクトースは、動物の生命活動に必要な基幹的な糖であり、一般に乳製品等を介して供給されているために、これまで高血糖状態の動物に対するガラクトースの血糖低下効果について検討されたことはなく、そのような効果があることを示唆されることもなかった。このような動物の生命活動に基幹的な役割を持つ糖に、高血糖状態の動物に対する血糖低下効果があることを見出したことは、これまでにない非常に安全な血糖低下剤を見出したことになる。また、ガラクトースには、ガラクトース血症のように糖代謝系に障害がある人を除き、特に問題となる毒性も報告されていない。

【 0 0 3 1 】

また、ガラクトースは、ショ糖の甘味度を1としたときの甘味度が0.3で、0.5のグルコース程の甘さはないが適度な甘さがあり、エネルギーともなるので、栄養性の甘味料と捉えて用いることもできる。ガラクトース(誘導體)は、甘味に関してショ糖の代替として用いることができることによっても、糖尿病の予防又は症状改善に効果的である。また、甘味度がさほど強くないことは、血糖低下剤としての添加量が多くなった場合でも、通常用いる甘味料を代替するものと考えれば味への影響が少ないという点で優れている。

【 0 0 3 2 】

[単離されたガラクトースホモポリマー]

本発明における「ガラクトースホモポリマー」とは、ガラクトースのみが2個以上結合した多糖類のことである。その分子量(結合数)に限定はないが、その結合数は好ましくは10個以上、より好ましくは100個以上、特に好ましくは1000個以上である。ジオウから抽出された「単離されたガラクトースホモポリマー」を用いて、血糖値を低下させる効果を見出したが、「単離されたガラクトースホモポリマー」であれば、ジオウから抽出されたものでなくても当然その効果は同一であると考えられるので、本発明における「単離されたガラクトースホモポリマー」は、ジオウから抽出されたものには限定されない。また、「単離されたガラクトースホモポリマー」には、ガラクトースから人工的に合成されたものも含まれる。

【 0 0 3 3 】

[血糖低下効果の評価系及び血糖低下効果を有するガラクトース(誘導體)の決定方法]

本発明の血糖低下剤は、上記ガラクトース(誘導體)又は単離されたガラクトースホモポリマーが、少なくとも以下の工程(a')ないし(d')を含む工程によって決定されたものであることが好ましい。

(a') 無脊椎動物に糖(A)を摂取させることによって、該無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖(B)の濃度を上昇させる工程

(b') 上記工程(a)で得られた、脂肪体中又は血液中の糖(B)の濃度が上昇した無脊椎動物に、被検物質を投与する工程

(c') 上記被検物質が投与された無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖(B)の濃度を測定する工程

(d') 上記被検物質の中から、該無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖(B)の濃度を低下させる物質を選択する工程

【 0 0 3 4 】

また、上記ガラクトース(誘導體)は、少なくとも、以下の工程(a)ないし(d)を含む工程によって決定されたものであることが特に好ましい。

(a) 無脊椎動物に糖を摂取させることによって、該無脊椎動物の脂肪体中又は血液中のグルコース濃度を上昇させる工程

(b) 上記工程(a)で得られた、脂肪体中又は血液中のグルコース濃度が上昇した無脊椎動物に、被検物質を投与する工程

(c) 上記被検物質が投与された無脊椎動物の脂肪体中又は血液中のグルコース濃度を測定する工程

10

20

30

40

50

(d) 上記被検物質の中から、該無脊椎動物の脂肪体中又は血液中のグルコース濃度を低下させる物質を選択する工程

【0035】

以下の説明と実施例中の評価実験例で示すように、上記「工程(a')ないし(d')を含む工程」、上記「工程(a)ないし(d)を含む工程」を使用すれば、ヒト等に対する血糖低下剤が正確にスクリーニングできる。ガラクトースとガラクトースホモポリマーは、かかる工程によって見出されたので、確実にヒト等に対する血糖低下剤としての効果を有する。更に、上記「工程(a')ないし(d')を含む工程」を用いれば、種々のガラクトース誘導体の中から、ヒト等に対して効果を有する血糖低下剤のスクリーニングができることは明らかである。

10

【0036】

上記「工程(a')ないし(d')を含む工程」によれば、高血糖状態の動物の血糖値を低下させる効果を有している薬剤のスクリーニングができるので、インスリン代替の薬剤のスクリーニングができることはもとより、インスリンが既に無脊椎動物中にあることもあり、またインスリンを別途無脊椎動物に投与しておけば、インスリン抵抗性改善薬(インスリン抵抗性を取り除く物質)のスクリーニングも可能である。

【0037】

本発明の一態様は、少なくとも、上記「工程(a')ないし(d')」、好ましくは、上記「工程(a)ないし(d)」を含み、被検物質がガラクトース誘導体であることを特徴とする糖尿病の治療薬のスクリーニング方法である。

20

【0038】

<工程(a)>

無脊椎動物としては、昆虫綱、甲殻綱、ムカデ綱、クモ綱等の節足動物門に属するものが好ましく、鱗翅目、甲虫目、双翅目、膜翅目、直翅目、網翅目等の昆虫綱に属するものがより好ましい。昆虫綱に属するもの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。取り扱いの便宜性から、昆虫綱に属するものの幼虫であることが特に好ましい。かかる幼虫としては特に限定はないが、具体的には、鱗翅目(ガ、チョウ等を含む)、甲虫目(カブトムシ等を含む)、双翅目(ハエを含む)、膜翅目(ゴキブリを含む)、直翅目(バッタを含む)、網翅目(ハチを含む)等に属するものの幼虫が好ましいものとして挙げられる。これらのうち、完全変態型昆虫の幼虫がより好ましく、完全変態型昆虫の実質的に無毛の幼虫が特に好ましい。完全変態型昆虫とは、卵、幼虫、蛹、成虫の成長過程を経る昆虫で、その多くが幼虫時は「いもむし」と呼ばれる栄養補給に特化した実質的に無毛で単純な形態をしており、その動きも緩慢であるため、完全変態型昆虫の幼虫は、薬剤等の注射が容易である点から特に適している。

30

【0039】

更に、かかる幼虫としては、以下の点から、カイコが特に好ましい。

(1) 入手が容易である。

(2) 飼育する方法が既に確立されており、更に飼育に利便性がある。

(3) ヒト等の哺乳類の内臓・器官と類似する性質が、これまでの研究である程度分かっている。

40

(4) 遺伝系統が確立されており、遺伝的均一性の維持ができています。

(5) 比較的大型で、動きが緩慢であり、実質上無毛なので、定量的に注射できる等、薬物の投与が容易である。

(6) 脂肪体を有しており、脂肪体を取り出して、含有する物質の定量が可能である。

(7) マウス、ラット等に比べると安価で、狭いスペースで多数の個体を飼育でき、倫理的な問題も少ない為、スクリーニング的な評価を行うことが容易である。

(8) 被検物質が少量しかない場合でも評価を行うことができる。

(9) 齢を揃える等、同じ状態の個体を揃えることが容易である。

(10) 体液を採取して、糖、脂質、酵素等の成分を解析することが可能である。

【0040】

50

以上のうち、(5)以降は完全変態型昆虫の幼虫全般にいえる特色となっており、完全変態型昆虫の実質的に無毛の幼虫が実験動物として優れた特徴を持っている。上記幼虫は、糖(A)の摂取させやすさ、被検物質の投与のしやすさ、血液や脂肪体の採取のしやすさ等の観点から、大型の幼虫であることが好ましい。ここで「大型の幼虫」とは、体長が1cm以上である幼虫であり、好ましくは、1.5cm以上15cm以下であり、特に好ましくは、2cm以上5cm以下である。また、カイコ等の場合は、4齢～5齢の幼虫が好ましく、5齢の幼虫が特に好ましい。

【0041】

糖(A)の摂取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る。具体的には、例えば、血液中への注射、飼料(餌)への添加等による経口摂取、腸内への注入等が挙げられ、簡便である点、及びヒトの臨床との対応という点で、腸管内部への注射、飼料(餌)への添加等による経口摂取が好ましい。

10

【0042】

上記糖(A)としては、その無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖(B)の濃度を上昇させるものであれば特に限定はないが、例えば、グルコース、ヘプトース、ヘキソース、ペントース、テトロース、トリオース等の単糖類；トレハロース、マルトース、ラクトース、スクロース、セロビオース、ニゲロース、ソホロース等の2糖類；フルクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、乳果オリゴ糖等のオリゴ糖；デンプン、グリコーゲン、セルロース、ペクチン、グルコマンナン等の多糖類；デオキシ糖；ウロン酸等の糖の酸化生成物；ソルビット、アラビット等の糖アルコール等が、糖(B)の濃度を上昇させる可能性があるものとして挙げられる。このうち、グルコース、スクロース、オリゴ糖、グリコーゲン又はでんぷんが、カイコの血液中のグルコース濃度及び/又はトレハロース濃度を上昇させる点、ヒト臨床との対応の点等から特に好ましい。これらは1種を用いてもよいし、2種以上を混合して用いてもよい。

20

【0043】

工程(a)においては、該無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖(B)濃度を上昇させることが必須である。糖(B)としては、糖(A)の摂取によって脂肪体中又は血液中の濃度が上昇し、被検物質が投与されたときに、その濃度の低下が測定できるものであれば特に限定はないが、例えば、グルコース、トレハロース等が挙げられる。また、糖(B)の定量方法によっては複数種類の糖の合計量が定量される場合があるが、その場合は、糖(B)は1種に限定されない。

30

【0044】

糖(A)と糖(B)は同一の場合も異なる場合もある。例えば、カイコの場合、糖(A)としてスクロースを投与すると直ちにカイコの血液中のグルコース濃度とトレハロース濃度が上昇する。この場合の糖(B)はグルコースとトレハロースである。

【0045】

糖(B)の定量方法は、全ての糖類の定量にはフェノール硫酸法、アンスロン硫酸法、カルバゾール硫酸法等が挙げられ；グルコースの定量にはグルコースオキシダーゼ法等が挙げられる。

【0046】

工程(a)で得られた「脂肪体中又は血液中の糖(B)の濃度が上昇した無脊椎動物」における「糖(B)の濃度の上昇の程度」は、ガラクトース(誘導体)の効果が確認できる程度に大きければ特に限定はないが、糖(A)を摂取させない通常のものに比較して、1.5倍～100倍が好ましく、1.5倍～8倍がより好ましく、1.5倍～3倍が特に好ましい。「糖(B)の濃度の上昇の程度」が低すぎる場合は、ガラクトース(誘導体)の効果が確認できない場合がある。一方、上限については、上記範囲より高くできなかったり、また、必要性がなかったりする場合がある。また、必要以上に高くしようとすると、血糖値上昇以外の個体の障害が生じ、著しい場合には個体が死亡してしまう場合がある。

40

【0047】

50

具体的には、血液中の糖（B）の濃度の場合には、7 mg/mL（ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）～200 mg/mL（ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）が好ましく、8 mg/mL～150 mg/mLがより好ましく、10 mg/mL～100 mg/mLが特に好ましい。また、脂肪体中のグルコース濃度の場合には、10 ng/ μg ～1000000 ng/ μg が好ましく、100 ng/ μg ～10000 ng/ μg がより好ましく、1000 ng/ μg ～20000 ng/ μg が特に好ましい。濃度の測定方法と表現方法は実施例の方法による。

【0048】

<工程（b）>

工程（b）では、上記工程（a）で得られた「脂肪体中又は血液中の糖（B）の濃度が上昇した無脊椎動物」に対してガラクトース（誘導体）を投与する。

10

【0049】

ガラクトース（誘導体）を投与する方法としては、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。具体的には、例えば、血液中への注射、飼料（餌）への添加等による経口摂取、腸内への注入等が挙げられる。簡便である点、ヒトとの対応という点で、腸管内部への注射、経口摂取が好ましい。ガラクトース（誘導体）の投与量としては特に制限はなく、無脊椎動物の種類、投与方法等に応じて適宜選択することができる。また、生理食塩水、水等で希釈して投与させることも好ましい。

【0050】

ガラクトース（誘導体）は水溶性の低分子量有機化合物であり、腸管から傍細胞経路と呼ばれる、トランスポーターを介さない経路により、すなわち、傍細胞輸送により、大量に血液内に取り込まれると考えられている。例えば、以下の文献（1）及び（2）には、ガラクトースが傍細胞輸送という経路で吸収されることが示されている。「傍細胞輸送」とは、腸管の細胞の間を栄養分が通過する輸送のことで、濃度が高くても効率的に輸送される。従って、ガラクトース（誘導体）は、腸管から極めて効率的に吸収されるため、投与方法として血液中への注射、腸管内部への注射及び経口摂取の何れか1つでガラクトース（誘導体）の効果が得られれば、その効果はその他の投与方法でも、同様に得られると合理的に考えられる。

20

【0051】

文献（1）：

In vivo

increase of passive intestinal absorption by cotransporter activation in rat.

Perez M,

Barber A, Ponz F., Rev Esp Fisiol. 1993 Dec;49(4):259-64.

文献（2）：

Galactose

transport inhibition by cytochalasin E in rat intestine in vitro.

Díez-Sampedro

A, Urdaneta E, Lostao MP, Barber A., Can J Physiol Pharmacol. 1999

Feb;77(2):96-101.

30

【0052】

ガラクトース（誘導体）の投与時期は特に限定はなく、工程（a）において糖（A）を摂取させ終えた直後、該無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖（B）の濃度がほぼ最大値に達した時点、血液中の糖（B）の濃度が正常値にまで回復してゆく時点等が挙げられるが、該無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖（B）の濃度がほぼ最大値に達した時点が、実験結果の再現性を得るという点で好ましい。具体的には、「糖（A）を摂取させ終えた直後」が特に好ましい。

40

【0053】

<工程（c）>

工程（c）では、上記工程（b）で、ガラクトース（誘導体）が投与された無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖（B）の濃度を測定する。測定試料の採取方法は脂肪体に関し

50

ては、解剖して採取することが好ましく、血液に関しては、切り傷を付けてそこから採取する方法が好ましい。

【0054】

糖(B)の種類、糖(B)の濃度及びグルコースの濃度の測定方法としては、工程(a)の箇所で記載した方法と同様の方法が挙げられる。すなわち、糖(B)としては、糖(A)の摂取によって脂肪体中又は血液中の濃度が上昇し、被検物質が投与されたときに、その濃度の低下が測定できるものであれば特に限定はないが、例えば、グルコース、トレハロース等が挙げられる。また、糖(B)は1種に限定されず、全ての糖(B)の合計量を測定してもよい。ただし、糖(B)にはガラクトース(誘導体)もガラクトースホモポリマーも含まれない。

10

【0055】

例えば、カイコの場合、糖(A)の摂取によって、カイコの血液中のグルコース濃度とトレハロース濃度が上昇する場合が多いので、糖(B)としては、グルコース又はトレハロースであることが好ましい。また、血液中に、工程(b)で投与したガラクトース(誘導体)が検出される場合は、ガラクトース(誘導体)の量を除いた糖(B)のみの定量をすること、又は、糖(B)の中のグルコースのみの定量をすることが好ましい。

【0056】

前記した通り、糖(B)の定量方法としては、全ての糖類の定量にはフェノール硫酸法、アンスロン硫酸法、カルバゾール硫酸法等が挙げられ；グルコースのみの定量方法としてはグルコースオキシダーゼ法等が挙げられる。

20

【0057】

脂肪体中又は血液中の糖(B)の濃度の測定をする時期については特に限定はなく、工程(b)においてガラクトース(誘導体)が投与された直後から、ガラクトース(誘導体)による糖(B)の濃度の減少の効果が見られなくなるまでの期間から選択すればよい。具体的には、例えば、被検物質が投与された時点から1分~1日が好ましく、30分~10時間が特に好ましい。

【0058】

糖(B)の濃度の測定に際しては、ガラクトース(誘導体)を投与していない、「同様に脂肪体中又は血液中の糖(B)の濃度を上昇させた無脊椎動物」を陰性対照として用いることが好ましい。陰性対照には、例えば、生理食塩水を同量だけを投与することが好ましい。陰性対照に比較して、ガラクトース(誘導体)を投与したもので、糖(B)の濃度がどれくらい減少していたかによって、そのガラクトース(誘導体)を評価する。

30

【0059】

<工程(d)>

工程(d)において、上記工程(a)、(b)及び(c)によって使用されたガラクトース(誘導体)の中から、該無脊椎動物の脂肪体中又は血液中の糖(B)の濃度を低下させる物質を選択する。

【0060】

実施例で詳述するが、高血糖カイコを用いた場合、糖(B)の濃度は、インスリンで60%にまで減少、メトホルミンで70%にまで減少、5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleoside(以下、「AICAR」と略記する)で80%にまで減少した。これは、工程(a)~(d)を含む工程でスクリーニングされた物質、すなわち上記工程(d)で選択された被検物質が、血糖低下剤としての効果を有しており、このスクリーニング方法が2型糖尿病治療薬・予防薬のスクリーニングに極めて有効であることを示している。従って、ガラクトース(誘導体)の血糖低下効果もこの方法で評価でき、血糖低下効果を有するものを決定できることは明らかである。

40

【0061】

陰性対照に比較して、ガラクトース(誘導体)を投与したもので、グルコース濃度がどれくらいまでに減少した場合に有意差と判定してその被検物質を選択するかについては、評価実験例に示す、インスリン、メトホルミン及びAICARの結果から導き出すに、陰

50

性対照のグルコース濃度の95%以下～80%以下にまで減少した場合である。

【0062】

実施例で詳述するが、D-ガラクトースを高血糖カイコに摂取させた場合、グルコース濃度が、60%以下～70%以下になった。このことは、D-ガラクトースが血糖低下剤として有効であり、2型糖尿病の予防又は症状改善のために効果的であることを示している。また、この事実は、ガラクトース(誘導体)の中で、血糖低下剤として有効なものを、工程(a)～(d)を含む工程でスクリーニングができることを示している。

【0063】

[[評価系の作用・原理]]

工程(a)～(d)を含む工程で、ヒト等の血糖値を低下させる物質をスクリーニングできる作用・原理は明らかではないが、以下のことが考えられる。すなわち、カイコ等は血糖値の恒常性を維持する機構を有しており、筋肉及び人の肝臓に相当する脂肪体に糖を貯蔵でき、また、インスリン様ペプチドホルモンであるボンビキシンを有しており、ボンビキシンの下流には、ヒトの場合と同様なMAPKシグナル伝達経路を含むインスリンシグナル伝達経路が存在する。また、組み換え型ヒトインスリンがPI3キナーゼの活性化を介して、カイコの脂肪体の糖の取り込みを亢進させる作用を有する。更に、インスリンシグナル伝達経路以外の経路であるAMPキナーゼの活性化により、カイコの血糖値は低下する。すなわち、カイコにはヒトの血糖調節機構と同様な機構があるために、ヒト等の血糖値を低下させる物質をスクリーニングでき、血糖低下剤としてガラクトース及びガラクトースホモポリマーが発見できたと考えられる、また、そのために、ガラクトース(誘導体)の中から、血糖低下剤をスクリーニングできるものと考えられる。

10

20

【0064】

[血糖低下剤]

本発明は、ガラクトース(誘導体)又は単離されたガラクトースホモポリマーを有効成分として含有することを特徴とする血糖低下剤である。ガラクトースホモポリマーは単離されたことが必須であって、植物体等の抽出液等のように、ガラクトースホモポリマーが単離されずに含有されている血糖低下剤は本発明には含まれない。

【0065】

ガラクトース(誘導体)とガラクトースホモポリマーは安定な物質であって、吸湿性も強くないので、取り扱いに特に注意を要しない。従って、原末のまま用いる場合；液剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、丸剤等の各種の剤形に製剤化する場合；飲食品に添加する場合；等を問わず、あらゆる形態で用いることができる。

30

【0066】

ガラクトース(誘導体)や単離されたガラクトースホモポリマーを製剤化する場合、賦形剤としては特に限定はないが、無機塩類、ステアリン酸マグネシウム等の有機酸塩類、タルク等のフィラー類、クエン酸等の有機酸類等を挙げることができる。ガラクトース(誘導体)や単離されたガラクトースホモポリマーは、賦形剤等の通常製剤化に用いられる物質を用いなくても、それ自体で製剤化が可能なので、液剤を除き、100質量%までの任意の含量を選択することができる。各製剤中のガラクトース(誘導体)や単離されたガラクトースホモポリマーの含量は、その製剤の適用対象；治療、改善、予防等の適用目的；他の剤との併用等の適用方法；等によって適宜調整すればよい。

40

【0067】

[飲食品]

本発明の一態様は、ガラクトース(誘導体)又は単離されたガラクトースホモポリマーを有効成分として含有する血糖低下剤を添加してなることを特徴とする糖尿病の予防又は症状改善のための飲食品である。すなわち、ガラクトース又はガラクトース誘導体が血糖低下の有効成分として添加されてなることを特徴とする飲食品であり、また、単離されたガラクトースホモポリマーが血糖低下の有効成分として添加されてなることを特徴とする飲食品である。

【0068】

50

ここで「飲食品」には、ヒトが摂取する全ての飲み物や食品が含まれる。また、本発明の飲食品には、家畜、家禽類、ペット等が摂取するための飼料も含まれる。「添加」とは、飲食品を製造する際に、物質を外部から加えることをいい、既に製造された飲食品中で経時と共に化学反応等で物質が生成して、結果としてその飲食品中に含有されることになった場合は含まれない。すなわち、例えば、乳糖等が飲食品中で分解して、結果として、D-ガラクトースがその飲食品中に含有されることになった場合は、本発明には含まれない。また、本発明は、ガラクトースホモポリマーが単離された形で添加された飲食品であり、「植物体等の抽出液そのもの」のように、最初からガラクトースホモポリマーが種々の多成分中の1成分として含有されている飲食品は本発明には含まれず、最初からガラクトースホモポリマーが種々の多成分中の1成分として含有されている「植物体等からの抽出液」を、そのまま添加した飲食品も本発明には含まれない。

10

【0069】

本発明の一態様は、ガラクトース（誘導体）又は単離されたガラクトースホモポリマーが血糖低下の有効成分として添加されてなることを特徴とする飲食品である。「血糖低下の有効成分」とは、血糖値を低下させ、糖尿病の予防又は症状改善に効果的な成分である。「添加」の定義は上記と同様である。また、飲食品に該ガラクトース（誘導体）又は単離されたガラクトースホモポリマーが血糖低下の有効成分として含まれていることをたとえ標榜していなくても本発明に含まれる。また、明確に全く異なる目的のみで添加させている場合を除き、該ガラクトース（誘導体）又は単離されたガラクトースホモポリマーの添加が血糖低下をもたらすことを認識していなくても本発明に含まれる。

20

【0070】

飼料を含む飲食品にガラクトース（誘導体）又は単離されたガラクトースホモポリマーを添加して用いる場合には、味、摂取カロリー量、コスト等を勘案して添加量を決定すればよく、ガラクトース（誘導体）等の性状による添加量の制限は特にない。上記したように、他の甘味料を代替する形式であれば、血糖低下剤として添加した場合でも比較的多い添加量を選択することもできる。

【実施例】

【0071】

以下、本発明について、実施例により具体的に説明するが、本発明は、その要旨を超えない限りこれらの実施例に限定されるものではない。

30

【0072】

本発明の完成には、カイコ等の無脊椎動物を用いた血糖低下剤の評価系の存在が重要であり、かかる評価系を発明者が有していたことにより、従来、哺乳動物の高血糖動物モデルを用いた段階の検討まで行われることがなかったガラクトースという生命活動に基幹的な役割を有する単糖が、単独でも血糖低下効果を有する血糖低下剤の有効成分として用いることができるという本発明の根幹を想到することができたものである。そのため、カイコを用いた血糖低下剤の評価系について、まず、評価例及び評価実験例1～11で詳述する。

【0073】

下記する評価例及び評価実験例1～11は、この評価系が血糖低下の有効成分をスクリーニングする上で正しいものであることを示すのと同時に、ガラクトース（誘導体）の中から、血糖低下を示すものを正確にスクリーニングできることをも示す。また、実施例で用いたガラクトースが、人、家畜、家禽類、ペット等において血糖値を低下させる効果が確実にあることを示すものである。

40

【0074】

[評価例]

<カイコの種類、飼育条件>

カイコの受精卵（交雑種Hu・Yo x T u k u b a ・ N e）は、愛媛蚕種株式会社から購入した。孵化した幼虫は室温で人工飼料シルクメイト2S（日本農産工業株式会社製）を与えて5齢幼虫まで育てた。飼育容器は卵から2齢幼虫までを角型2号シャーレ（

50

栄研器材製)、それ以降をディスプレイのプラスチック製フードパック(フードパックFD 大深、中央化学株式会社製)を用いた。飼育温度は27とした。

【0075】

以下の評価実験例で用いる通常飼料給餌に用いる飼料は、人工飼料シルクメイト2S(日本農産工業株式会社製)であり、グルコース添加飼料給餌に用いる飼料は、人工飼料シルクメイト2S(日本農産工業株式会社製)に所定の質量比でD-グルコースを混合して調製したものである。本評価実験例において、「絶食群(以下、適宜「St」と記載することもある)」とは、所定期間中全く餌を給餌しなかったカイコ群であり、「通常飼料給餌群(以下、適宜「ND」と記載することもある)」とは、人工飼料シルクメイト2Sを所定期間給餌したカイコ群であり、「グルコース添加飼料給餌群(以下、適宜「GD」と記載することもある)」とは、所定の質量比でグルコースを混合した飼料を所定期間給餌したカイコ群のことである。

10

【0076】

< 試薬 >

以下の評価実験例で用いる「組み換え型インスリン」は、インスリン(Sigma社製)を0.1%の酢酸を含む生理食塩水(0.9%NaCl)に溶解して用いた。メトホルミン(1,1-Dimethylbiguanide Hydrochloride、和光純薬社製)は、生理食塩水に溶解して用いた。ワートマニン(wortmanin)はCALBIOCHEMより購入したものをDMSOに溶解して用いた。

20

【0077】

< 血液中の糖濃度の測定方法 >

カイコの血液中の糖濃度(以下、「血糖値」と略記する)の測定方法は以下の通りである。カイコの血液は、第一腹肢に切り傷をつけた所から、約100 μ L採取し、タンパク質を沈殿させるために、9倍量の0.6N(規定)過塩素酸と混合した。3000rpmで10分間遠心分離し、体液抽出液(hemolymph extract)(上清)を得た。

【0078】

血糖値はフェノール硫酸法(Hodge et al)により定量した。上記体液抽出液を蒸留水で10倍希釈したもの100 μ Lと、5%(w/v)フェノール水溶液100 μ Lとを混合し、濃硫酸500 μ Lを加えて激しく攪拌した。室温で20分間静置した後、490nmの吸光度を測定した。グルコース水溶液を標準糖溶液として血糖値を算出した。単位「mg/mL」の分母はカイコの血液の体積である。

30

【0079】

< 血液中のグルコース濃度の測定方法 >

カイコの血液中のグルコース濃度は、通常のグルコースオキシダーゼ法に従い定量した。上記の血液中の糖濃度の測定と同様にして、体液抽出液(hemolymph extract)(上清)を得た後、蒸留水で適当な濃度に希釈したもの20 μ Lに、酵素反応液(0.12M Na-phosphate buffer(pH7.4)、4units/mL of glucose oxidase、3units/mL of peroxidase、9mM o-dianisidine)400 μ Lとを混合し、室温で40分放置した。その後、70%濃硫酸100 μ Lを加えて激しく攪拌し、530nmにおける吸光度を測定した。グルコース水溶液を標準糖溶液として、グルコース濃度を算出した。単位「mg/mL」の分母は、カイコの体液抽出液の体積である。

40

【0080】

< 脂肪体中の糖濃度の測定方法 >

カイコの脂肪体中の糖濃度の測定方法は、以下の通りである。カイコの脂肪体は、ハサミで体腔を開いてピンセットにより取り出し、生理食塩水中で洗った後、終濃度30%(w/v)となるように水酸化カリウム(KOH)を加え、100にて5分間熱処理した。更にエチルアルコールを終濃度60%(v/v)となるまで加え、煮沸して糖を沈殿させ、4で一晩静置した後、遠心(3000rpm、15分)により集め、定量した。糖

50

濃度の測定方法は、上記血液中の糖濃度の測定方法と同様である。単位「 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 」(又は「 mg/g 」)の分母はカイコの脂肪体の質量である。

【0081】

<脂肪体の糖取り込み量の測定方法>

絶食させた5齢2日目のカイコを背側から解剖し、脂肪体を摘出した。摘出した脂肪体はInsect saline (130mM NaCl / 5mM KCl / 1mM CaCl_2)で洗浄した後、質量を測定し、ペニシリン、ストレプトマイシン及びグルコースを添加したGrace's insect medium 200 μL 中で27において馴染ませた。ワートマニン(wortmanin)を用いた実験においては、同時に培地中にワートマニンを加えた。30分間の前培養の後、培地にインスリン(3mg/mL)50 μL を添加し、27で引き続き培養を続けた。培養後、上記方法で脂肪体抽出液を調製し、脂肪体中の糖濃度の測定を行い、脂肪体の質量当たりの糖取り込み量を算出した。単位「 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 」の分母はカイコの脂肪体の質量である。

10

【0082】

<脂肪体のリン酸化Akt量の測定方法>

カイコから摘出した脂肪体を、Insect saline (130mM NaCl / 5mM KCl / 1mM CaCl_2)で洗浄した後、ペニシリン、ストレプトマイシンを添加したGrace's insect medium 200 μL 中で27において馴染ませた。ワートマニン(wortmanin)を用いた実験においては、同時に培地中にワートマニンを加えた。30分間の前培養の後、培地にインスリン(3mg/mL)を50 μL 添加し、27で1時間培養した。脂肪体をInsect saline (130mM NaCl / 5mM KCl / 1mM CaCl_2)で洗浄した後、NP-40 lysis buffer (10mM Tris / HCl (pH=7.5)、150mM NaCl、0.5mM EDTA、1mM DTT (ジチオスレイトール)、1% NP-40、10mM NaF、1mM Na_3VO_4) 250 μL の溶液と混合し、20秒間、超音波処理した。その後、TCA沈殿を行い、タンパク質をSDS電気泳動し、PVDFメンブレンに移行させた。抗Akt抗体及び抗リン酸化Akt抗体を用いてウエスタンブロットを行い、脂肪体のリン酸化Akt量(リン酸化Akt量/全Akt量)を測定した。

20

【0083】

<被検物質の投与の方法>

評価実験例4、評価実験例5及び評価実験例9において、5齢1日目のカイコの第5体節の模様部に、被検物質をそれぞれ所定量含む0.05mLの生理食塩水を注射した。また、対照としては、それぞれ同量である0.05mLの生理食塩水のみを注射した。注射筒(1mL)と注射針(27G x 3/4)はテルモ株式会社製を使用した。

30

【0084】

評価実験例1

カイコに糖を含む餌を摂取させることにより、カイコの血糖値が上昇するか否かを検討した。5齢1日目のカイコを、「絶食群」、「通常飼料給餌群」、「15%(w/w)グルコース添加飼料給餌群」に分け、それぞれ10匹に対し、27で、15%(w/w)のグルコースを含む餌を1日間及び3日間与えた。その後、血糖値(hemolymph sugar) (mg/mL)及び脂肪体中の糖濃度($\mu\text{g}/\text{mg}$)を測定した。その結果を、それぞれ図1(A)及び図1(B)に示す。

40

【0085】

図1(A)から分かるように、給餌開始後1日目及び3日目のカイコの何れにおいても、グルコース添加飼料給餌群では、通常飼料給餌群と比べて約3倍高い血糖値を示した。なお、絶食群の血糖値は、通常飼料給餌群の約1/2であった。

【0086】

また、図1(B)から分かるように、給餌開始後1日目のカイコの脂肪体中の糖濃度において、グルコース添加飼料給餌群では、通常飼料給餌群と比べて約2倍高い値を示した。なお、絶食群の糖濃度は、通常飼料給餌群の1/10以下であった。

50

【0087】

従って、以上から、グルコース添加飼料をカイコに与えることにより、カイコの血糖値及び脂肪体の糖濃度が上昇することが分かった。これらの結果より、カイコにおいても、ヒトと同様に、血糖値の増加により、脂肪体中に糖が取り込まれて貯蔵されることが示唆された。

【0088】

評価実験例 2

5 齢 1 日目のカイコに対し、それぞれ、3 匹ずつに、グルコース 33% (w/w) を含む餌 (33% Glucose Diet) を摂取させたときの血糖値の経時的推移を調べた。すなわち、給餌開始前、給餌開始 30 分後、60 分後、180 分後のカイコの血糖値をそれぞれ同様にして測定した。結果を図 2 に示す。

10

【0089】

図 2 から分かるように、給餌開始 30 分後では、給餌開始前の約 2 倍、給餌開始 60 分後及び 180 分後では何れも、給餌開始前の約 3 倍に血糖値が上昇していた。以上の結果は、カイコにおいても、哺乳類と同様に、糖の経口摂取により血糖値が速やかに上昇することを示している。なお、この範囲の時間経過では、通常飼料給餌群 (Normal Diet) と絶食群 (Starvation) では、血糖値の変化はみられなかった。

【0090】

評価実験例 3

餌に含まれる糖の含有割合を変化させて、カイコの血糖値の変動を調べた。すなわち、5 齢 1 日目のカイコを、「通常飼料給餌群」、「8% (w/w) グルコース添加飼料給餌群」、「16% (w/w) グルコース添加飼料給餌群」、「33% (w/w) グルコース添加飼料給餌群」に分けて、それぞれ 3 匹ずつを 27 で飼育し、給餌開始後 60 分後に血糖値を測定した。結果を図 3 に示す。同様にして給餌開始後 180 分後の血糖値を測定した。結果を図 9 に示す。

20

【0091】

図 3、図 9 から分かるように、各群の平均血糖値は、グルコース含量を 33% としても飽和せずに餌のグルコースの含量割合に依存して上昇した。

【0092】

評価実験例 4

評価実験例 1 ~ 3 及び評価実験例 7 ~ 9 で、カイコを高血糖状態にする条件が見出された。次に、臨床において用いられる血糖低下薬が、高血糖状態のカイコの血糖値を低下させるか否かを検討した。5 齢 1 日目のカイコ (体重 1 ± 0.1 g) に、16% (w/w) グルコース添加飼料を与え、27 で 60 分間飼育後、それぞれ 3 匹ずつ、血液中に「生理食塩水 0.05 mL を投与」及び「組み換え型ヒトインスリン 0.36 mg を含有する 0.05 mL の生理食塩水溶液を投与」し、投与から 6 時間後に血液を採取し、糖濃度の定量を行った。結果を図 4 に示す。

30

【0093】

図 4 から分かるように、インスリン投与群の血糖値は、生理食塩水投与群の血糖値と比べて、約 6 割まで低下していた。このことから、組み換え型ヒトインスリンは、カイコの血糖値を低下させる作用を有することが示された。

40

【0094】

評価実験例 5

臨床において用いられる、ヒトの血糖低下薬であるメトホルミンが、高血糖状態のカイコの血糖値を低下させるか否かを検討した。メトホルミンは、解糖の促進を作用機序とするピグアナイド系の血糖低下薬として知られているものである。すなわち、評価実験例 4 において、「組み換え型ヒトインスリン 0.36 mg / 生理食塩水 0.05 mL」の代わりに、「メトホルミン 0.1 mg / 生理食塩水 0.05 mL」を投与した以外は、評価実験例 4 と同様の操作をし、その後、糖濃度の定量を行った。結果を図 5 に示す。

【0095】

50

図5から分かるように、メトホルミン投与群の血糖値は、生理食塩水投与群の血糖値と比べて、約7割まで低下していた。このことから、メトホルミンはカイコの血糖値を低下させる作用を有することが示された。

【0096】

なお、投与したメトホルミン量(100mg/g)は、ヒトの1日最高投与量(12.5mg/g)の約10倍の量であった。メトホルミンはインスリンとは異なる作用機構により血糖値を下げる薬剤である。従って、カイコを用いた方法は、1型糖尿病ばかりでなく、インスリン分泌低下によらない2型糖尿病に有効な治療薬の評価、スクリーニング、製造にも有効であることが分かった。

【0097】

評価実験例6

次に、インスリンのカイコの血糖値低下作用のED50値の算出を試みた。5齢1日目のカイコに9%(w/w)グルコース添加飼料を与え、27で60分間飼育後、生理食塩水、及び組み換え型ヒトインスリン(0.005mg~0.5mg)を投与し、6時間後に血液を採取し、血中の糖濃度を定量した。3%(w/w)グルコース添加飼料群の血糖値まで低下したときを100%とした相対的な血糖値低下率のグラフを図6に示す。

【0098】

図6から分かるように、インスリンによるカイコの血糖低下作用のED50値は、0.015mg/gであった。臨床において、1日にヒトに投与されるインスリン量は、0.14~3.53mgである。算出されたED50値は、体重60kgのヒトに対する1日投与量の1000倍程度であった。

【0099】

評価実験例7

5齢1日目のカイコに対し、それぞれ、3匹ずつに、グルコース15%(w/w)を含む餌を摂取させたときの血糖値及びカイコの血液中のグルコース濃度の経時的推移を調べた。すなわち、給餌開始前、給餌開始30分後、60分後、180分後のカイコの血糖値及びカイコの血液中のグルコース濃度をそれぞれ同様にして測定した。結果を図7に示す。次に、カイコに27で60分間グルコース12%(w/w)を含む餌を摂取させた後、絶食させたときのカイコの血糖値の経時的推移を調べた。すなわち、給餌前、給餌開始1時間後(絶食開始0時間後)、絶食開始2時間後、5時間後、8時間後のカイコの血糖値をそれぞれ同様にして測定した。結果を図8に示す。

【0100】

図7(a)から分かるように、給餌開始30分後では、給餌開始前の約2倍、給餌開始60分後及び180分後では、給餌開始前の約3倍以上、約6倍以上に血糖値が上昇していた。15%グルコース添加飼料給餌群においても同様に、速やかに血液中のグルコース濃度が上昇していた(図7(b))。以上の結果は、カイコにおいても、哺乳類と同様に、糖の経口摂取により血糖値及び血液中のグルコース濃度が速やかに上昇することを示している。なお、この範囲の時間経過では、通常飼料給餌群(Normal Diet)と絶食群(Starvation)では、血糖値及び血液中のグルコース濃度の変化はみられなかった。また、図8から分かるように、絶食開始2時間後からカイコの血糖値が低下始めた。この結果は、カイコが哺乳類と同様に糖の過剰摂取により血糖値が上昇し、時間の経過に伴い減少することを示唆している。

【0101】

評価実験例8

5齢1日目のカイコ、それぞれ3匹ずつに、通常飼料又は5%、10%、15%、30%(w/w)グルコース添加飼料をそれぞれ与え、27で3日間飼育後のカイコの体長、体重、血糖値を測定した。また、5齢1日目のカイコに同条件下、何も飼料を与えないで飼育後、同様にして体長、体重、血糖値を測定した。結果を図10に示す。

【0102】

図10より、各グルコース添加飼料給餌群(5%、10%、15%、30%GD)は、

10

20

30

40

50

通常飼料給餌群 (Normal Diet; ND) より何れも体長が短く、体重が軽かった (図 10 (a) ~ (c))。このときの血糖値は、グルコースの添加量により上昇していた (図 10 (d))。また、カイコにグルコース溶液を注射することによっても、同様の成長障害が起こることがわかった (データ示さず)。これらの結果より、カイコは血糖値の上昇により、成長が障害されることを示唆している。

【0103】

評価実験例 9

5 齢 1 日目のカイコ (体重 1 ± 0.1 g) に、12% (w/w) グルコース添加飼料を与え、27 で 60 分間飼育後、それぞれ 3 匹ずつ、血液中に「生理食塩水 0.05 mL を投与」又は「組み換え型ヒトインスリン 0.36 mg を含有する 0.05 mL の生理食塩水溶液を投与」し、投与から 1 時間後、3 時間後、6 時間後に血液を採取し、血糖値を測定した。更に、5 齢 1 日目のカイコに、12% (w/w) グルコース添加飼料を与え、27 で 60 分間飼育後、それぞれ 3 匹ずつ、血液中に「組み換え型ヒトインスリン (0.005 mg ~ 0.5 mg) を含有する 0.05 mL の生理食塩水溶液を投与」し、6 時間後に血液を採取し、血糖値を測定した。図 11 (b) における単位「 $\mu\text{g/g}$ 」の分母はカイコの体重である。結果を図 11 に示す。

【0104】

次に、5 齢 1 日目のカイコ、それぞれ 3 匹ずつから脂肪体を摘出し、1 質量% グルコースを添加した Grace's medium に生理食塩水又は組み換え型ヒトインスリン 0.7 mg を投与し、27 3 時間培養後、摘出した脂肪体のリン酸化 Akt 量及び糖取り込み量を測定した。また、5 齢 1 日目のカイコから摘出した脂肪体をワートマニン (wortmannin) 処理したのも同様にグルコースを添加し、組み換え型ヒトインスリンを投与して培養し、脂肪体のリン酸化 Akt 量及び脂肪体質量当たりの糖取り込み量を測定した。更に、脂肪体のリン酸化 Akt 量を定性的に確認するため、抗 Akt 抗体、及び抗リン酸化 Akt 抗体を用いてそれぞれのサンプルについて測定を行った。結果を図 11 に示す。

【0105】

図 11 (a) 及び (b) から分かるように、インスリン投与群の血糖値は生理食塩水投与群と比べて、約 6 割まで低下することが判明した (図 11 (a))。また、ヒトインスリンの投与量に依存してカイコの血糖値は低下した (図 11 (b))。これらの結果は、組み換え型ヒトインスリンがカイコの血糖値を低下させる作用を有することを示唆している。

【0106】

図 11 (c) 及び (d) から分かるように、摘出した脂肪体を用いた *in vitro* の組織培養液に組み換え型ヒトインスリンを添加することにより、脂肪体のリン酸化 Akt 量が増加した。また、組み換え型ヒトインスリンの添加により、脂肪体質量当たりの糖取り込み量も増加した (図 11 (e))。更に、この組み換え型ヒトインスリンによる Akt のリン酸化及び脂肪体の糖取り込み量の増加は、PI3 キナーゼの阻害剤である wortmannin 処理により抑圧されることが分かった (図 11 (c) ~ (e))。これらの結果より、組み換え型ヒトインスリンが PI3 キナーゼの活性化を介して、カイコの脂肪体の糖の取り込みを亢進させる作用を有することを示唆している。したがって、組み換え型ヒトインスリンによるカイコの血糖低下作用は、ヒトにおける作用と同様のメカニズムであると考えられる。

【0107】

評価実験例 10

5 齢 1 日目のカイコ、それぞれ 3 匹ずつに、12% (w/w) グルコース添加飼料を与え、27 60 分間飼育後、「生理食塩水 1 mL のみ」又は「AICAR 4 mg / 生理食塩水 1 mL」を投与し、6 時間後に血液を採取し、血糖値を測定した。また、5 齢 1 日目のカイコの脂肪体を摘出し、500 μM の AICAR を 50 μL 加え、6 時間処理後、脂肪体中の AMPK 活性を、AMPK の人工基質である SAM5 ペプチドに 32P - AT

10

20

30

40

50

Pのリン酸を付加する反応を用いて測定した。結果を図12に示す。

【0108】

図12(a)から分かるように、AICAR投与群のカイコの血糖値は、生理食塩水のみ投与群と比較して低下していた(図12(a))。この結果より、AMPキナーゼの活性化剤であるAICARがカイコに対して血糖低下作用を示すことが分かった。また、抽出した脂肪体をAICARで処理することにより、AMPK活性が増強することがわかった(図12(b))。以上より、投与したAICARは、ヒトと同様のメカニズムでカイコの脂肪体に作用し、AMPK活性を促進させることを示唆している。

【0109】

一方、グリベンクラミドの注射では、カイコの血糖値の低下は見られなかった(データ示さず)。SU剤の一種であるグリベンクラミドは、膵臓の細胞のSUレセプターと結合して、インスリンの放出を促進する薬剤である。カイコにおいては、膵臓と同様の機能をする臓器が確認されていない。グリベンクラミドの投与によりカイコの血糖値が低下しなかったことは、カイコには、哺乳類の膵臓の細胞様の細胞が存在しないことが原因の一つであると考えられる。したがって、カイコを用いた場合には、グリベンクラミドのようなインスリン放出促進作用を有する薬剤の評価は行えないと考えられる。

【0110】

評価実験例11

5歳1日目のカイコ、それぞれ3匹ずつに、通常飼料(Normal Diet; ND)、12%(w/w)グルコース添加飼料(Glucose Diet; GD)及び12%(w/w)グルコース添加飼料(Glucose Diet; GD)と、組み換え型ヒトインスリン3.5mg/mLを50µL、12時間ごとに5回注射し、27-4日間飼育後、カイコの体長、体重を測定した。結果を図13に示す。

【0111】

12%グルコース添加飼料(GD)を4日間給餌したカイコは、通常飼料(ND)給餌群のカイコより、体長が小さく、体重が減少しており、成長の障害が観察された(図13(b)~(d))。12%グルコース添加飼料(GD)及び組み換え型ヒトインスリンを12時間ごとに5回注射した場合は、組み換え型ヒトインスリンを注射しないものより、体長の増大と、体重の増加が認められた(図13(a)~(d))。この結果は、高血糖状態によるカイコの成長障害が組み換え型ヒトインスリンによる血糖値の低下により回復することを示唆している。

【0112】

評価実験例1~評価実験例11によって、カイコの血糖値は飼料に添加した糖(A)の濃度及び給餌時間に依存して上昇すること、及び高血糖状態のカイコに血糖低下薬であるインスリン、メトホルミン、AICARを投与することにより、カイコの血糖値が低下することが明らかになった。任意に選んだ「ヒトに効果がある上記3物質」で、特定状態のカイコの血糖値が低下することが明らかになったことにより、本発明の方法は、少なくともヒトの血糖値を低下させる可能性がある全ての薬剤の評価・スクリーニング方法として、十分に確立しているものである。

【0113】

血糖値の上昇により引き起こされたカイコの成長障害が、ヒトインスリンの血糖低下作用により回復した。糖尿病マウスモデルでは、長期間の飼育により尿毒症や足の麻痺がおこることが知られているが、高血糖によるカイコの成長障害は、数日で観察可能であり、このことから、ヒト等の血糖値を低下させる物質を、簡便、正確に評価・スクリーニングする方法である。

【0114】

臨床では、食後の血糖値が健常人の2倍以上であると高血糖状態であると判断される。餌に含まれる糖濃度、及び給餌時間の調節により、カイコを高血糖状態(通常の餌を給餌した場合の2倍の血糖値)にする条件を見出した(評価実験例2(図2)、評価実験例3(図3))。臨床において、血糖低下剤として用いられる組み換え型ヒトインスリン又は

10

20

30

40

50

メトホルミン、AICARの投与（注射）により、高血糖状態のカイコの血糖値が低下すること、及びインスリンによる血糖低下作用は、カイコとヒトで同程度であることから、カイコを用いて、ヒトの血糖低下剤の評価、スクリーニングができる。このカイコを用いた血糖低下剤の評価方法やスクリーニング方法を用い、カイコの血糖低下活性を指標に、ヒトに対する血糖低下剤の探索や決定が可能である。

【0115】

培養細胞系を用いて血糖低下剤の候補となる化合物をスクリーニングする方法が糖尿病治療薬の開発手法として一般的に行われている。しかしながら、一般に培養細胞系で効果を示すほとんどの化合物は、動物個体では血糖低下作用を示さない。その理由は、培養細胞系では、個体における薬物動態を反映できないためである。そのため、動物個体を用いた評価系の利用は必須である。

10

【0116】

上記したカイコを用いたあらゆる結果については、前記した「完全変態型昆虫の幼虫」、「体内に脂肪体を有している幼虫」、「昆虫綱に属する動物」等の無脊椎動物全般においても、同様の又は類似の結果が得られると考えることは常識であるから、単に「カイコ」には限定されないことは明らかである。

【0117】

以下、上記評価系を用いた実施例で、ガラクトースや単離されたガラクトースホモポリマーが血糖低下剤として有効であることを示す。

実施例 1

20

[ジオウの血糖低下効果の主体となる成分の検討]

[[ジオウ熱水抽出物のエタノール沈殿画分の調製]]

ジオウ（ウチダ和漢薬社製）238gを、100%エタノール500mLで抽出処理し、この抽出残渣を粉碎後に沸騰水浴中70%含水エタノール500mLで8時間2回抽出処理を行った。この抽出残渣を沸騰水浴中の水500mLで8時間3回熱水抽出した。この抽出液の1/4を以降の操作に供した。先の熱水抽出液を蒸留水中で透析し、濃縮した後に3倍容の100%エタノールを攪拌しながら加えて4 で24時間放置した。その沈殿画分を遠心分離によって集め凍結乾燥品として1gのジオウ熱水抽出物のエタノール沈殿画分を得た。調製操作の流れを図18に示した。

【0118】

30

[[ジオウ熱水抽出物のエタノール沈殿画分に含まれる構成糖の分析]]

上記で調製したジオウ熱水抽出物のエタノール沈殿画分をトリフルオロ酢酸で加水分解後にTLCで展開し、硫酸により検出した。その結果、D-ガラクトースと同じ移動度を示すほぼ単一のスポットが検出された（図14）。この結果から、ジオウ熱水抽出画分に含まれる構成糖は主にD-ガラクトースであると考えられた。

【0119】

また、分子量等を測定した結果、ジオウ熱水抽出物のエタノール沈殿画分中の有効成分が、1000分子以上のD-ガラクトースが結合したD-ガラクトースホモポリマーであることが分かった。

【0120】

40

実施例 2

[ジオウ熱水抽出物エタノール沈殿画分とD-ガラクトースの血糖低下効果検討]

[[高血糖カイコモデルを用いた検討]]

高血糖カイコモデルは、5歳1日目のカイコに12質量%グルコース添加飼料を与え、27 で60分間飼育し、それを以下の検討に用いた。

【0121】

陰性対照として、0.9%生理食塩水を用い、陽性対照として、組み換え型ヒトインスリン（Sigma社）を、0.1%酢酸を含む生理食塩水に溶解させ、3.5mg/mL溶液として用いた。

【0122】

50

[被検体 1]

上記の「ジオウ熱水抽出物のエタノール沈殿画分」の凍結乾燥品を 0.9% 生理食塩水に溶解し、1 mg / mL 溶液とした。

[被検体 2]

D - ガラクトース (W A K O (和光純薬) 社) を、0.9% 生理食塩水に溶解し、1 mg / mL 溶液とした。

【 0 1 2 3 】

[体液抽出液]

カイコ体液 20 μ L は第一腹肢につけた傷口から採取し、9 倍量の 0.6 N (規定) 過塩素酸と混合してタンパク質を沈殿させた。3000 rpm 10 分間、遠心分離し体液抽出液を得た。

【 0 1 2 4 】

[糖濃度 (血糖値) の測定]

体液中の全ての種類の糖 (B) を合算した糖濃度 (血糖値) を評価する方法としてフェノール硫酸法 (Hodge et al.) を使用した。体液抽出液を蒸留水で適当な濃度で希釈したもの 100 μ L と 5% (w / v) フェノール水溶液 100 μ L を混合し、濃硫酸 500 μ L を加えて激しく攪拌した。室温で 20 分間静置した後に 490 nm での吸光度を測定した。グルコース標準溶液の値から糖濃度 (血糖値) を算出した。

【 0 1 2 5 】

[グルコース濃度の測定]

単糖としての D - ガラクトースを投与する場合、フェノール硫酸法では D - ガラクトースの影響がでる可能性があるため、グルコース濃度を評価できるグルコースオキシダーゼ法を使用した。蒸留水で適当な濃度に希釈した検体 20 μ L と酵素反応液 (0.12 モル Na - リン酸緩衝液 pH 7.4、グルコースオキシダーゼ 4 ユニット / mL、ペルオキシダーゼ 3 ユニット / mL、o - ジアニシジン 9 mM) 400 μ L を混合し、室温で 40 分間放置した。その後 70% 硫酸 100 μ L を加えて激しく攪拌し、530 nm における吸光度を測定した。グルコース標準液の値からグルコース濃度を算出した。

【 0 1 2 6 】

[高血糖カイコへの被検体投与と体液中の糖濃度 (血糖値) とグルコース濃度の測定]

生理食塩水、ヒトインスリン及び被検体 1 (ジオウ熱水抽出物のエタノール沈殿画分) を各々 0.05 mL 高血糖カイコに投与し、6 時間後に体液を採取して体液中の糖濃度 (血糖値) を測定した。それぞれの測定は 1 群 6 ~ 10 頭のカイコを用いて行った。得られた結果を図 15 に示す。

【 0 1 2 7 】

また、同様にして、生理食塩水、ヒトインスリン、被検体 2 (D - ガラクトース) を各々 0.05 mL 高血糖カイコに投与し、体液中のグルコース濃度を測定した。得られた結果を図 16 に示す。

【 0 1 2 8 】

< 結果 >

ジオウ熱水抽出物のエタノール沈殿画分を投与した高血糖カイコの血糖濃度は明確に低下した (図 15)。また、ジオウ熱水抽出物のエタノール沈殿画分の主たる構成糖である D - ガラクトースを投与した高血糖カイコのグルコース濃度も明確に低下した (図 16)。これより、D - ガラクトースホモポリマー及び D - ガラクトースが、血糖低下剤として有効であることが分かった。

【 0 1 2 9 】

実施例 3

[D - ガラクトースの血糖低下効果の検討]

[[高血糖マウスモデルを用いた検討]]

ストレプトゾトシン処理された高血糖マウスを使用した。高血糖マウスは、8 週齢、雄性 C57BL / 6 J Jc1 マウスであり、日本クレア社より購入し、血糖値が 230 m

10

20

30

40

50

g / mL 以上であることを確認後に検討に使用した。

【0130】

陰性対照として、0.9%生理食塩水を用い、被検体は、D-ガラクトース(WAKO(和光純薬)社)を、0.9%生理食塩水に溶解し2.5mg/mL溶液とした。グルコース濃度の測定は、上記と同様に行った。

【0131】

生理食塩水、被検体(D-ガラクトース)を各々0.5mL投与し、6時間後にマウス尻尾にはさみでつけた切り口から血液を採取した。血液20μLを用いて血液中のグルコース濃度を測定した。それぞれの測定は1群3匹のマウスを用いて行った。得られた結果を図17に示す。

10

【0132】

<結果>

ストレプトゾトシン処理によって高血糖となったマウスにD-ガラクトースを投与した場合には、陰性対照に対し血中グルコース濃度が明確に低下していた。このことから、D-ガラクトースには哺乳動物である高血糖マウスの血糖値を低下させる効果のあることが確認された。

【0133】

なお、ガラクトース(誘導体)は、前記した通り、傍細胞経路と呼ばれるトランスポーターを介さない経路により傍細胞輸送され、大量に血液内に取り込まれることが知られている(前記文献(1)、(2)参照)。従って、血液中への注射、腸管内部への注射及び経口摂取の何れか1つの投与方法で効果が得られれば、その効果はその他の投与方法でも同様に得られると考えられる。従って、実施例3の結果より、D-ガラクトースは、高血糖マウスの血糖値を、経口摂取によって低下させると考えられる。

20

【0134】

本発明により初めて、D-ガラクトース及び単離されたD-ガラクトースホモポリマーが血糖値を低下させる効果があることが明らかになり、新規糖尿病治療薬を提供できた。D-ガラクトースという生命活動に必須な糖を有効成分とする点で、従来報告されてきた血糖低下剤とは性格が明らかに異なるものである。その血糖低下効果のメカニズムはまだ明らかとなっていないが、今後更にD-ガラクトースによる血糖低下効果の機構を解析することにより、D-ガラクトース(誘導体)やD-ガラクトースホモポリマーの糖尿病治療や予防等における更なる有効利用が計られるものと考えられる。

30

【0135】

また、ガラクトースのような生体物質が細胞に作用する場合には、それが細胞表面上の受容体(receptor)タンパク質と結合し、そのシグナルが細胞内に伝達されるからである。従って、ガラクトースが作用する受容体に親和性のある物質であれば、ガラクトースでなくともガラクトース誘導体であれば、ガラクトースと同様に血糖低下作用を示すものが存在し得ることは自明である。

【0136】

上記したように、ガラクトース誘導体の中から、少なくとも前記工程(a')ないし(d')を含む工程によって、血糖低下剤がスクリーニング可能であるが、更に、既に血糖低下効果が期待されるガラクトース誘導体にスクリーニング対象が絞られているので、極めて効率的に血糖低下剤がスクリーニングできる。

40

【産業上の利用可能性】

【0137】

本発明の血糖低下剤は安全であり、製剤化、飲食品への添加等に適した性状を有しており、また従来血糖低下剤と異なる使い方が期待できるため、新たな血糖低下剤として広く利用できるものである。また、飲食品に添加することが容易なので、糖尿病の予防、改善用の機能性食品として広く利用することができる。

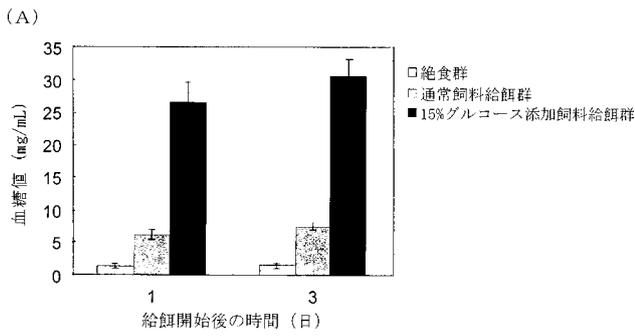
【0138】

本願は、2008年7月8日に出願した日本の特許出願である特願2008-1784

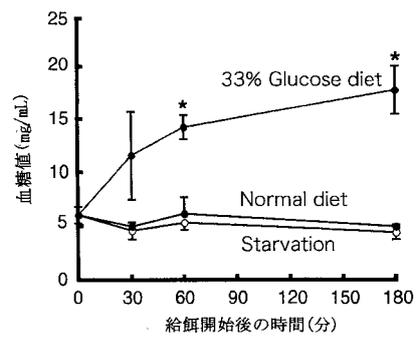
50

50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。

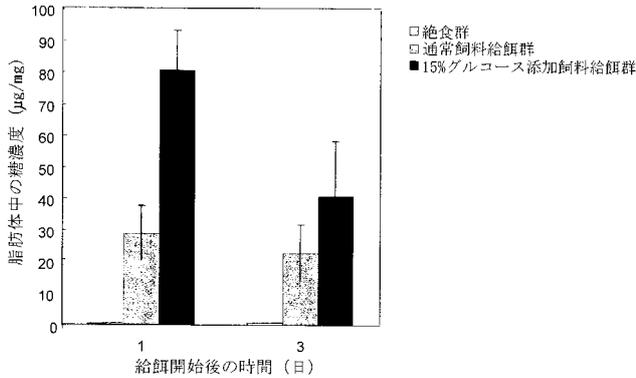
【 図 1 】



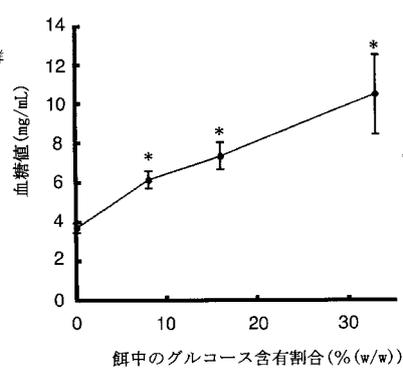
【 図 2 】



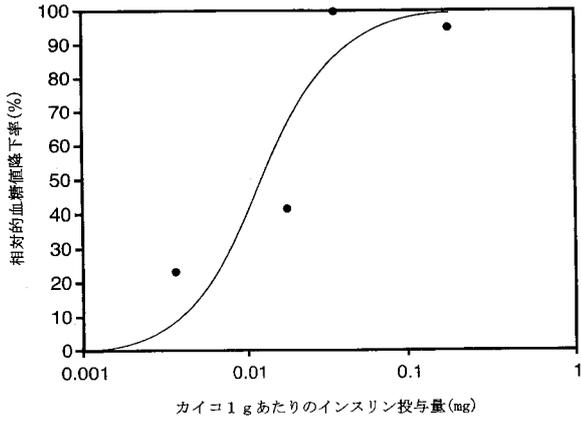
(B)



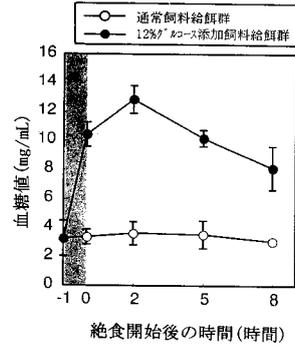
【 図 3 】



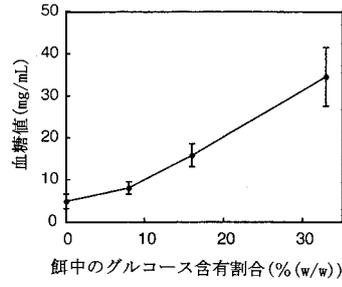
【 図 6 】



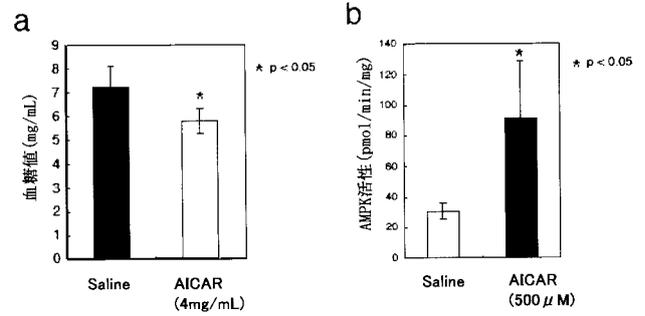
【 図 8 】



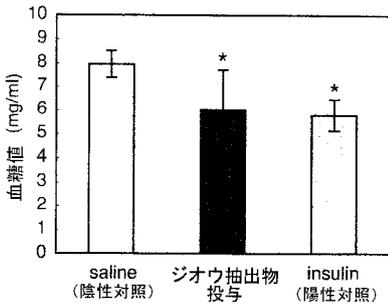
【 図 9 】



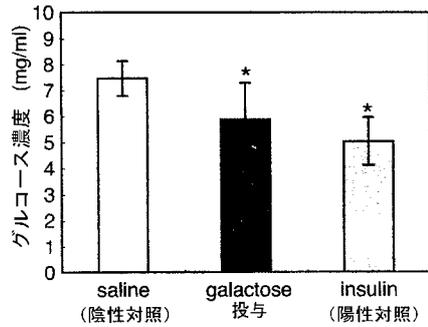
【 図 1 2 】



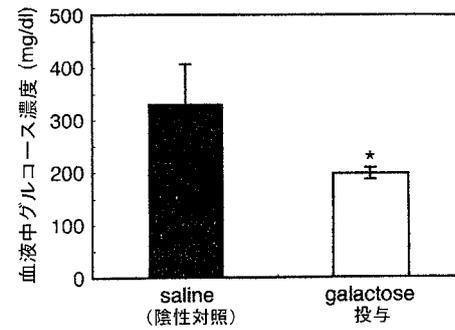
【 図 1 5 】



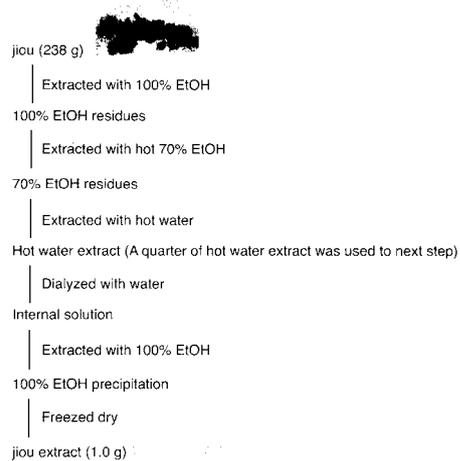
【 図 1 6 】



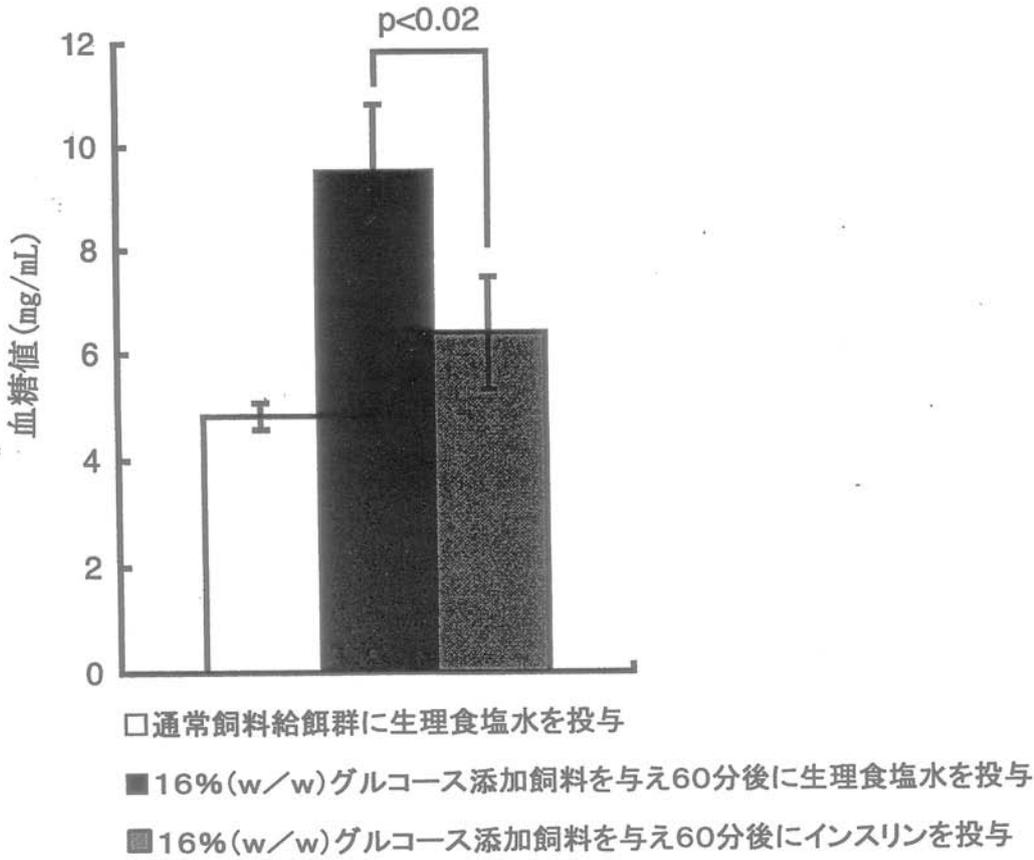
【 図 1 7 】



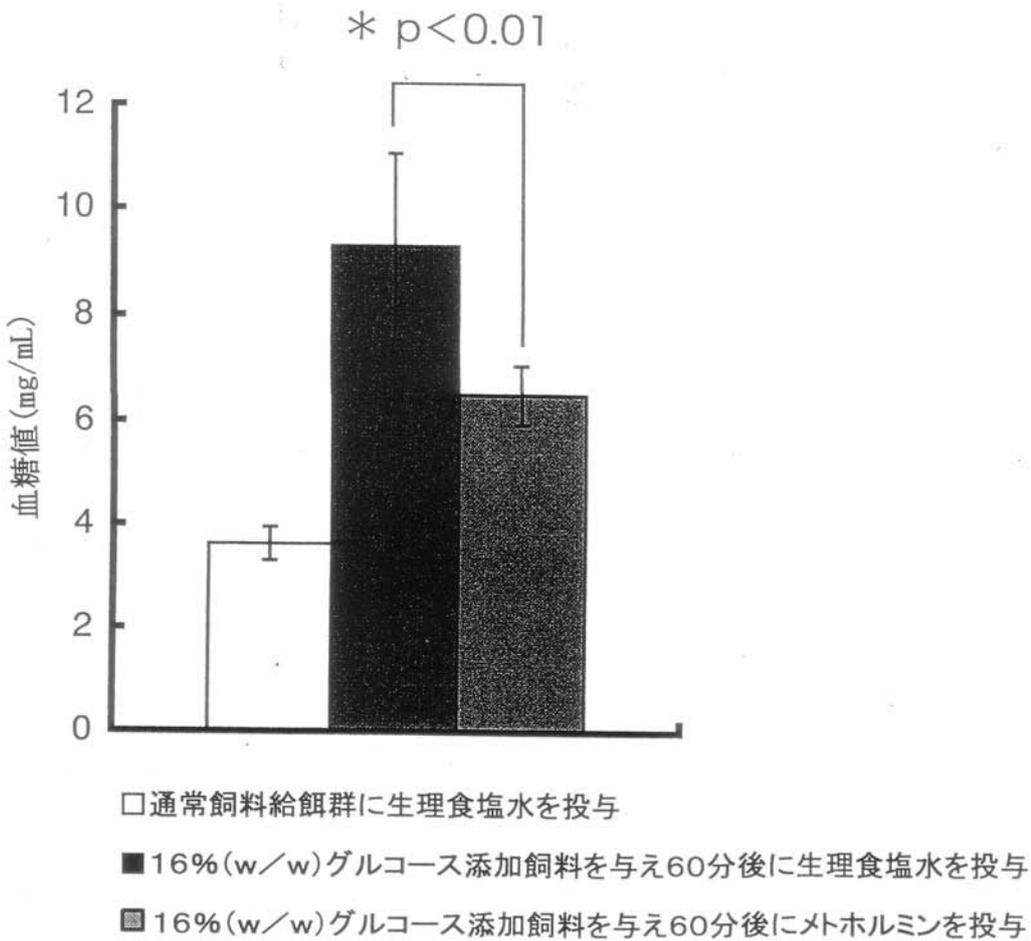
【 図 1 8 】



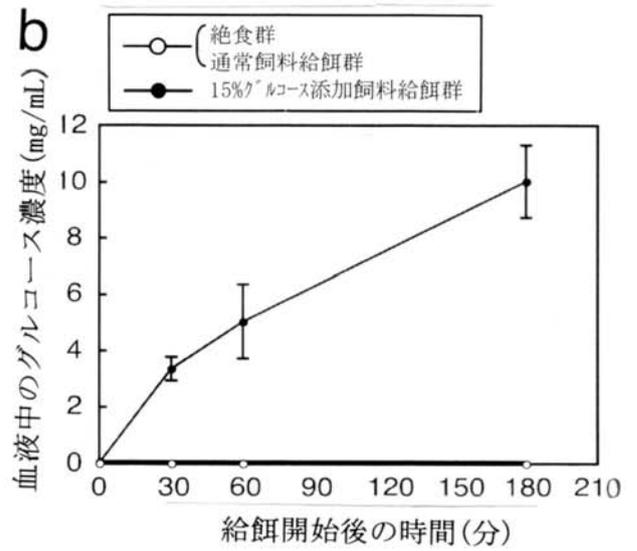
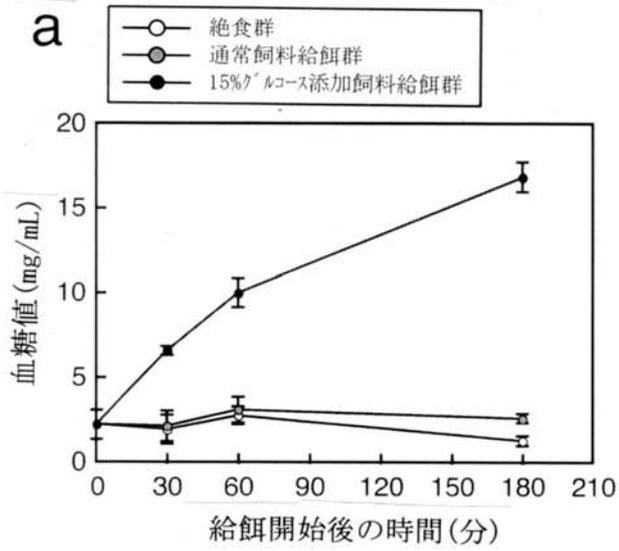
【 図 4 】



【 図 5 】

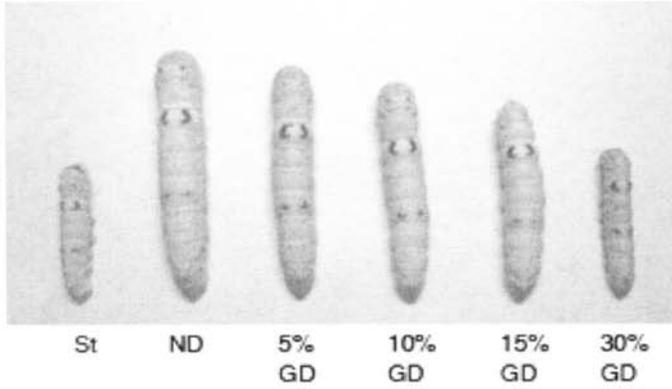


【図7】

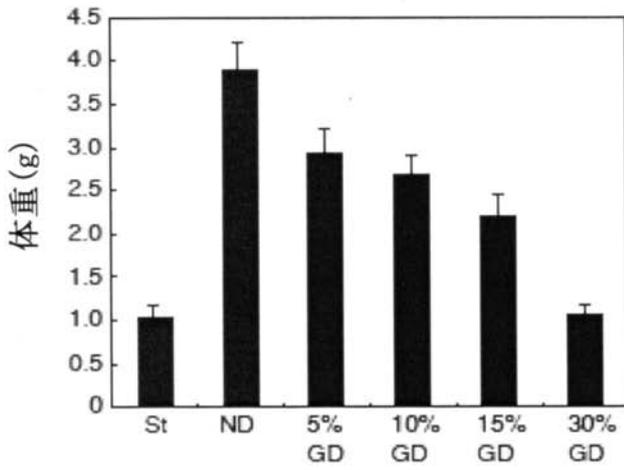


【 図 1 0 】

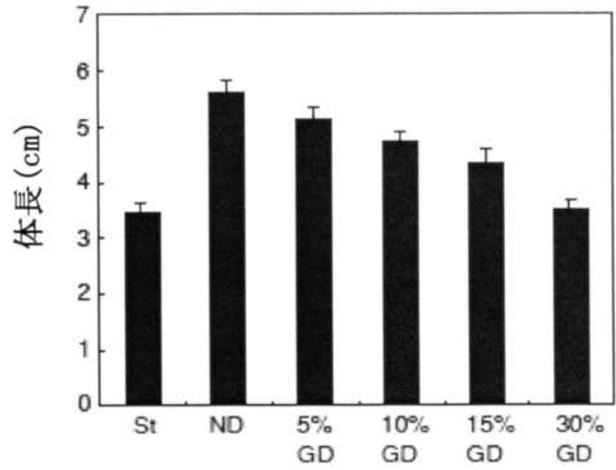
a



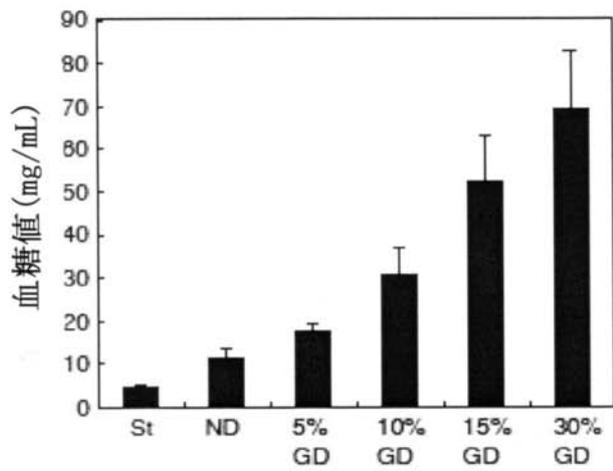
b



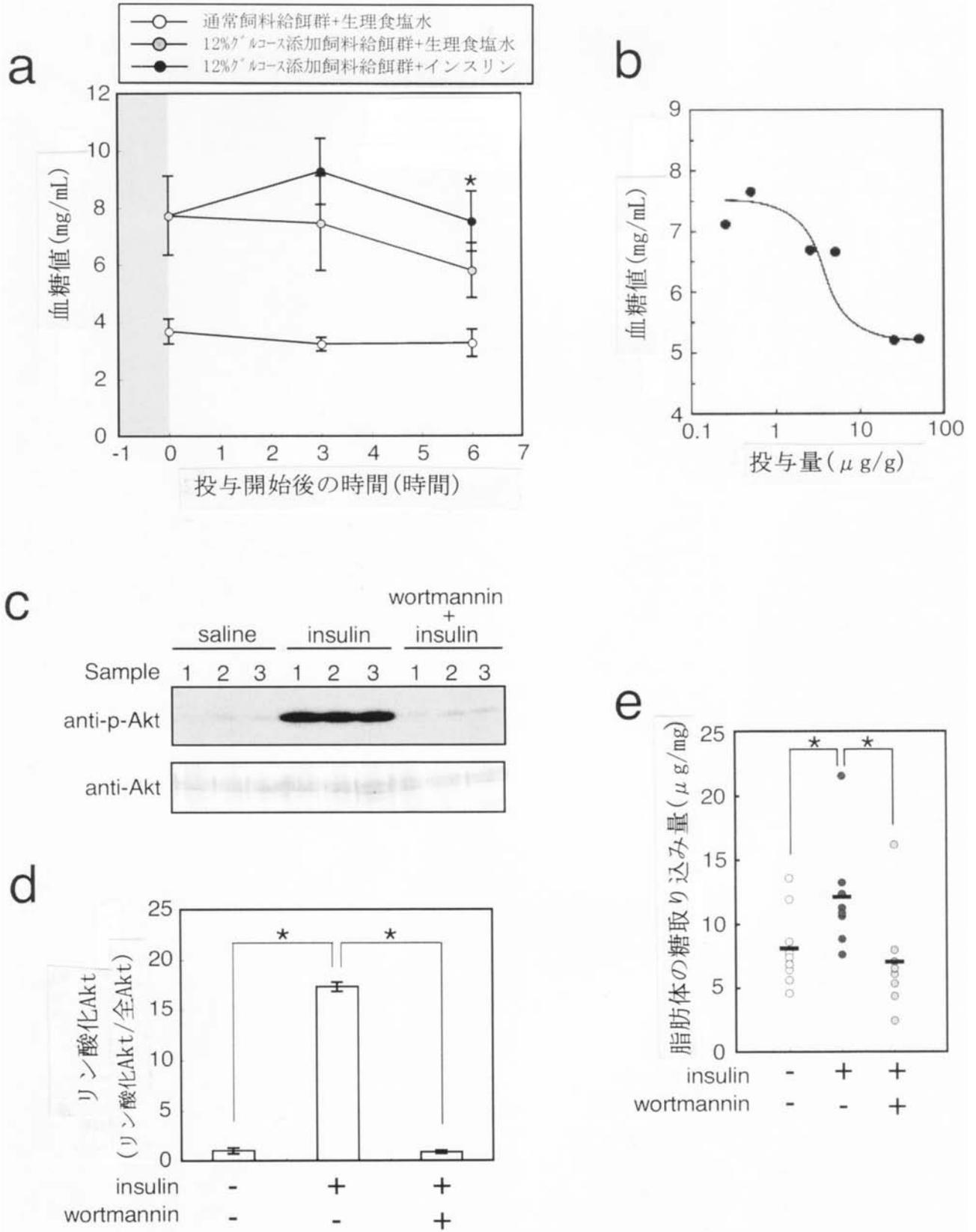
c



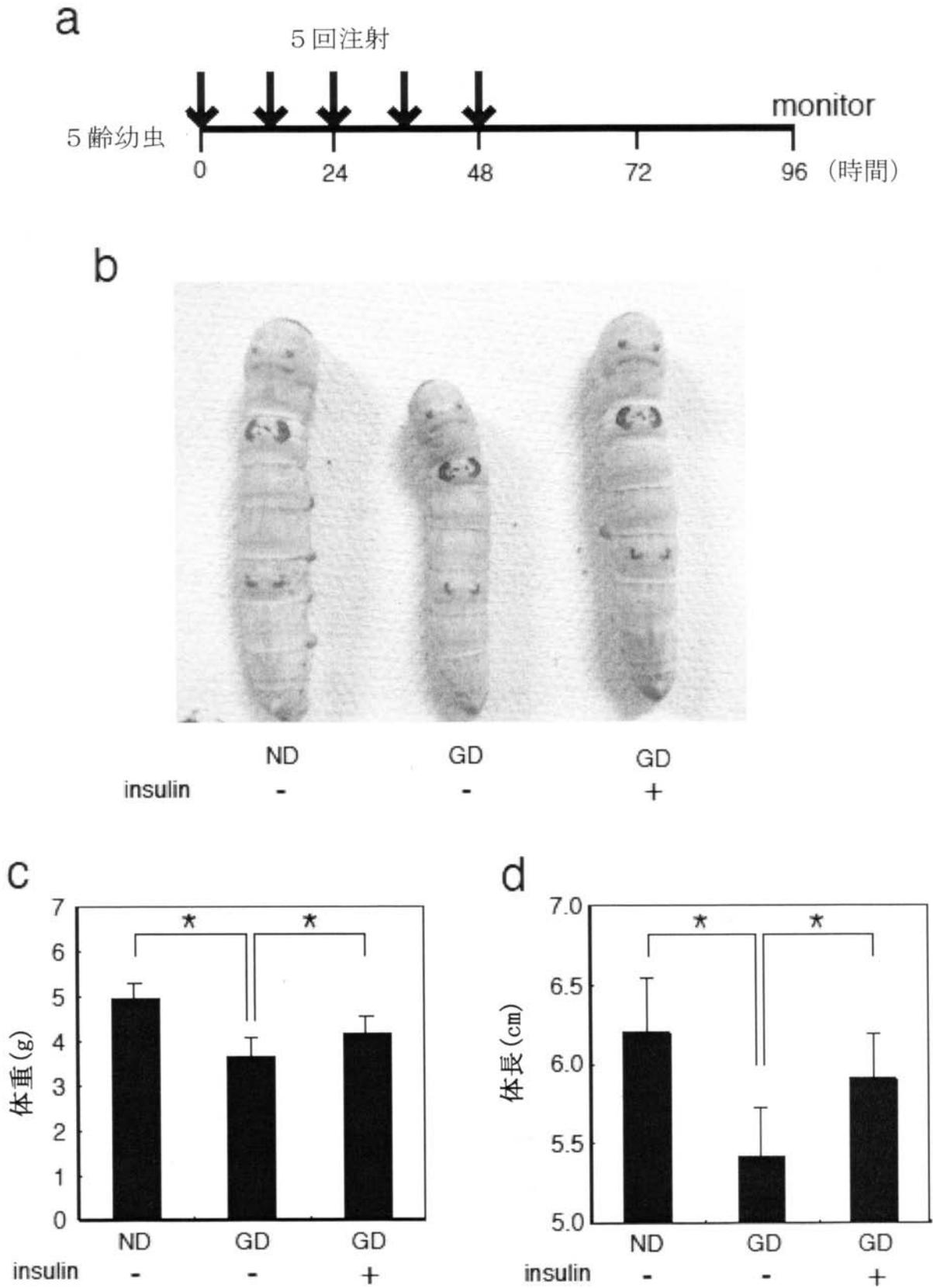
d



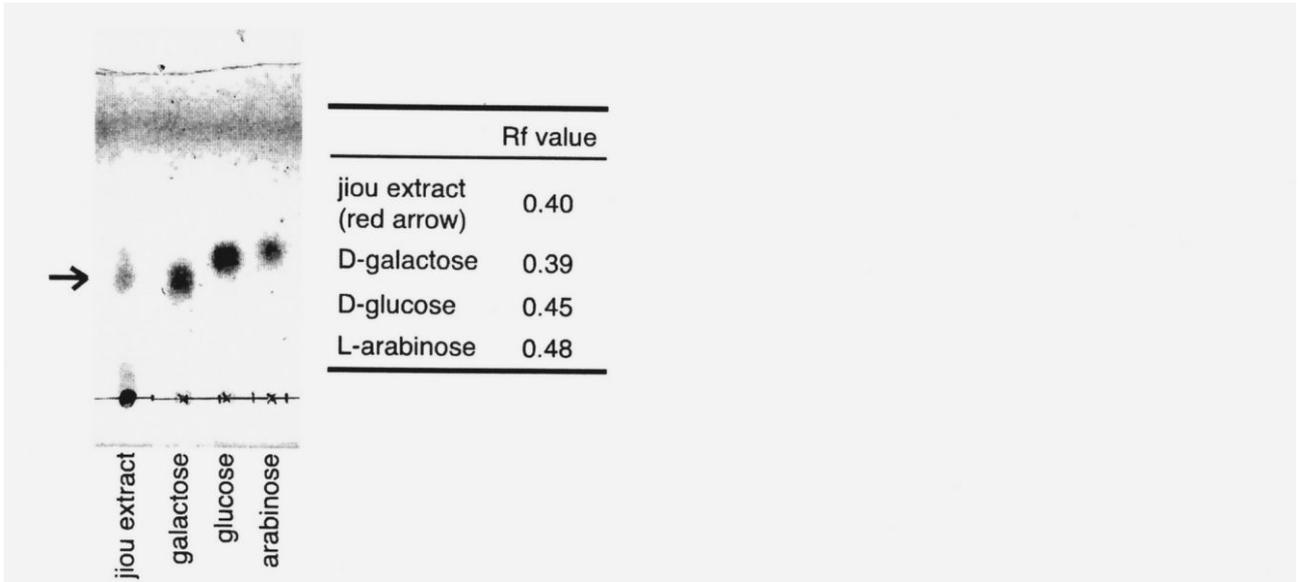
【 図 1 1 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2009/061978
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K31/7004(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A23L2/52(2006.01)i, A61K31/715(2006.01)i, A61P3/10(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) A61K31/7004, A23L1/30, A23L2/52, A61K31/715, A61P3/10 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 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009 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 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2006-508057 A (NOVARTIS AG.), 09 March, 2006 (09.03.06), Claims; examples & US 2004/0087514 A1 & EP 1536805 A1 & WO 2004/022074 A1	1, 3, 4, 8, 9 11
X Y	WO 2006/018294 A1 (M. KURT), 23 February, 2006 (23.02.06), Claims; examples & EP 1784195 A1	1, 3, 4, 8, 9 11
X	JP 61-286359 A (AMERICAN HOME PROD), 16 December, 1986 (16.12.86), Experimental example (a) & US 4672058 A & US 4672059 A & EP 206546 A2	3, 4, 9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 04 September, 2009 (04.09.09)		Date of mailing of the international search report 29 September, 2009 (29.09.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/061978

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Tadashi KIH0 et al., "Kaikai Jio Konkei no Tato Kakubun no Ketto Koka Sayo Narabini Seiyo Mouse Kanzo no To Taisha ni Oyobosu Eikyo", Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 1992, Vol.112, No.6, pages 393 to 400	2
X	JP 2000-169385 A (TAISHO PHARMA CO., LTD.), 20 June, 2000 (20.06.00), Claims; Par. No. [0002]; examples (Family: none)	2,3,5
Y	Eriko SUMITANI et al., "Kaiko Yochu o Mochiita Tonyobyo Chiryoyaku Screening-kei no Kochiku", Journal of Japanese Biochemical Society, 25 November, 2007 (25.11.07), P. 2P-1379	11
Y	Kazuhisa SEKIMIZU, "Model Kaiko o Mochiita Yukosei Screening", Kagaku to Yakugaku no Kyoshitsu, 22 November, 2007 (22.11.07), No.157, pages 7 to 8, 10 to 22	11
Y	Eriko SUMITANI et al., "Kaiko Yochu o Mochiita Tonyobyo Chiryoyaku Screening-kei no Kochiku", Abstracts of Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan, 05 March, 2008 (05.03.08), Vol.128th, No.3, page 5	11
A	EP 0970698 A1 (AFTING Ernst Guenter PROF DR D), 12 January, 2000 (12.01.00), Claims; examples & DE 19829844 A1 & AT 278407 T & ES 2230768 T	1,3,4,8,9,11
A	JP 11-171797 A (TOKYO GAS CO., LTD.), 29 June, 1999 (29.06.99), Claims; examples & US 6509002 B1 & EP 913161 A2 & EP 1304124 A1	1,3,4,8,9,11
A	Yoshikiyo MISUGI, "Glucose no Rittai Iseitai, Galactose no Fuka ni yoru Kecchu Insulin no Dotai ni Kansuru Rinshoteki Kenkyu", Folia endocrinologica Japonica, 1977, Vol.53, No.1, pages 9 to 16	1,3,4,8,9,11
A	Kimiharu ETO et al., "Keiko Galactose Fuka Shiken Ji no Kecchu Glucose no Hendo ni yoru Mansei Kan Shikkan no Taitono Ijo no Kento", Japanese Journal of gastroenterology, 1981.09, Vol.78, No.9, pages 1739 to 1746	1,3,4,8,9,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/061978

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/105852 A1 (FUJI SANGYO CO., LTD.), 10 November, 2005 (10.11.05), Claims; examples; Par. No. [0005] (Family: none)	2, 3, 5
A	JP 2006-182738 A (IPE KABUSHIKI KAISHA), 13 July, 2006 (13.07.06), Claims; examples; Par. No. [0004] (Family: none)	2, 3, 5
P, Y	JP 2009-58500 A (GENOME SOYAKU KENKYUSHO KABUSHIKI KAISHA), 19 March, 2009 (19.03.09), Claims; examples (Family: none)	11
P, X P, Y	MATSUMOTO Yasuhiko et al., Evaluation of anti-diabetic drugs using silkworm, Bombyx mori., Symposium on biomembrane-drug interaction, 01 August, 2008 (01.08.08), Vol.30th, page 87	2, 3, 5 11
P, Y,	Yasuhiko MATSUMOTO et al., "Kaiko o Mochiita Tonyobyo Chiryoyaku no Hyokakei no Kochiku: Hito Insulin, AICAR ni yoru Kaiko no Kettochi no Teika", Journal of Japanese Biochemical Society, 2008, page 2P-1306, (12 December, 2008 (12.12.08) Poster Happyo)	11
P, X P, Y	Takuya SUGITA et al., "Kaiko Yochu Ko Ketto Model o Mochiita Shoyaku Jio Chu no Ketto Koka Busshitsu no Dotei", Journal of Japanese Biochemical Society, 2008, page 2T21-8, (12 December, 2008 (12.12.08) Koto Happyo)	2, 3, 5 11
P, X P, Y	Yasuhiko MATSUMOTO et al., "Ko Ketto Model Kaiko o Mochiita Ketto Kokayaku no Hyokakei no Kakuritsu", Nippon Tonyobyo · Himan Dobutsu Gakkai Nenji Gakujutsu Shukai Program · Koen Shorokushu, 2009, Vol.23rd, page 54, (14 February, 2009 (14.02.09) Happyo)	2, 3, 5 11
P, X P, Y	Yasuhiko MATSUMOTO et al., "Kaiko Yochu Ko Ketto Model o Mochiita Shoyaku Jio Chu no Ketto Koka Busshitsu no Dotei", Abstracts of Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan, 05 March, 2009 (05.03.09), Vol.129th, No.4, page 178	2, 3, 5 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/061978

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 6, 7, 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 6, 7 and 10 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2009/061978									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K31/7004(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A23L2/52(2006.01)i, A61K31/715(2006.01)i, A61P3/10(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 (IPC)) Int.Cl. A61K31/7004, A23L1/30, A23L2/52, A61K31/715, A61P3/10											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2009年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2009年	日本国実用新案登録公報	1996-2009年	日本国登録実用新案公報	1994-2009年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2009年										
日本国実用新案登録公報	1996-2009年										
日本国登録実用新案公報	1994-2009年										
国際調査で使用了電子データベース (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 (JDreamII)											
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									
X Y	JP 2006-508057 A (NOVARTIS AG) 2006.03.09, 請求項、実施例 & US 2004/0087514 A1 & EP 1536805 A1 & WO 2004/022074 A1	1, 3, 4, 8, 9 11									
X Y	WO 2006/018294 A1 (M. KURT) 2006.02.23, 請求項、実施例 & EP 1784195 A1	1, 3, 4, 8, 9 11									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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		の日の後に公表された文献									
「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		「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									
「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		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 04.09.2009		国際調査報告の発送日 29.09.2009									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 岩下 直人	4C 3844								
		電話番号 03-3581-1101 内線	3452								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 6 1 9 7 8
C (続き) . 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
X	JP 61-286359 A (AMERICAN HOME PROD) 1986. 12. 16, 実験例 (a) & US 4672058 A & US 4672059 A & EP 206546 A2	3, 4, 9
X	木方 正他, 懷慶地黄根茎の多糖成分の血糖降下作用並びに正常マウス肝臓の糖代謝に及ぼす影響, 薬学雑誌, 1992, Vol. 112, No. 6, pp. 393-400	2
X	JP 2000-169385 A (TAISHO PHARMA CO LTD) 2000. 06. 20, 請求項、【0002】、実施例 (ファミリーなし)	2, 3, 5
Y	住谷瑛理子他, カイコ幼虫を用いた糖尿病治療薬スクリーニング系の構築, 生化学, 2007. 11. 25, P. 2P-1379	11
Y	関水 和久, モデルカイコを用いた有効性スクリーニング, 化学と薬学の教室, 2007. 11. 22, No. 157, pp. 7-8, 10-22	11
Y	住谷瑛理子他, カイコ幼虫を用いた糖尿病治療薬スクリーニング系の構築, 日本薬学会年会要旨集, 2008. 03. 05, Vol. 128th, No. 3, p. 5	11
A	EP 0970698 A1 (AFTING Ernst Guenter PROF DR D) 2000. 01. 12, 請求項、実施例 & DE 19829844 A1 & AT 278407 T & ES 2230768 T	1, 3, 4, 8, 9, 11
A	JP 11-171797 A (TOKYO GAS CO LTD) 1999. 06. 29, 請求項、実施例 & US 6509002 B1 & EP 913161 A2 & EP 1304124 A1	1, 3, 4, 8, 9, 11
A	三杉義潔, Glucose の立体異性体, Galactose の負荷による血中 Insulin の動態に関する臨床的研究, 日本内分泌学会雑誌, 1977, Vol. 53, No. 1, pp. 9-16	1, 3, 4, 8, 9, 11
A	衛藤公治他, 経口ガラクトース負荷試験時の血中グルコースの変動による慢性肝疾患の耐糖能異常の検討, 日本消化器病学会雑誌, 1981. 09, Vol. 78, No. 9, pp. 1739-1746	1, 3, 4, 8, 9, 11

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 6 1 9 7 8
C (続き) . 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
A	WO 2005/105852 A1 (FUJI SANGYO CO LTD) 2005. 11. 10, 請求項、実施例、[0005] (ファミリーなし)	2, 3, 5
A	JP 2006-182738 A (IPE KK) 2006. 07. 13, 請求項、実施例、【0004】 (ファミリーなし)	2, 3, 5
P, Y	JP 2009-58500 A (GENOME SOYAKU KENKYUSHO KK) 2009. 03. 19, 請求項、実施例 (ファミリーなし)	11
P, X P, Y	MATSUMOTO Yasuhiko et al., Evaluation of anti-diabetic drugs using silkworm, Bombyx mori., 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム講演要旨集, 2008. 08. 01, Vol. 30th, p. 87	2, 3, 5 11
P, Y,	松本靖彦他, カイコを用いた糖尿病治療薬の評価系の構築: ヒトインスリン, AICAR によるカイコの血糖値の低下, 生化学, 2008, p. 2P-1306, (2008. 12. 12 ポスター発表)	11
P, X P, Y	杉田拓也他, カイコ幼虫高血糖モデルを用いた生薬ジオウ中の血糖降下物質の同 定, 生化学, 2008, p. 2T21-8, (2008. 12. 12 口頭発表)	2, 3, 5 11
P, X P, Y	松本靖彦他, 高血糖モデルカイコを用いた血糖降下薬の評価系の確立, 日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会プログラム・講演抄録集, 2009, Vol. 23rd, p. 54, (2009. 02. 14 発表)	2, 3, 5 11
P, X P, Y	松本靖彦他, カイコ幼虫高血糖モデルを用いた生薬ジオウ中の血糖降下物質の同 定, 日本薬学会年会要旨集, 2009. 03. 05, Vol. 129th, No. 4, p. 178	2, 3, 5 11

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2009/061978

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 6、7、10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項6、7、10は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2007年4月)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 0 8 B 37/00 (2006.01) C 0 8 B 37/00 Z

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 小方 康至
 東京都文京区本郷七丁目3番1号 東京大学アントレプレナープラザ402号室 株式会社ゲノム創薬研究所内

Fターム(参考) 4B018 LB08 MD27 MD28 ME03
 4C057 BB01 BB02
 4C086 AA01 AA02 EA01 EA20 MA01 MA04 NA14 ZC35
 4C090 AA08 AA09 BA01 BA37 BB13 BC01 DA09 DA23

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。